Zur Differenzierung von Clostridium-Spezies aus Fleisch im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung

Hans Stöhr

1970

Aus dem Institut für Nahrungsmittelkunde der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München
Vorstand: Professor Dr. L. Kotter

ZUR DIFFERENZIERUNG VON CLOSTRIDIUM-SPEZIES AUS FLEISCH IM RAHMEN DER BAKTERIOLOGISCHEN FLEISCHUNTERSUCHUNG

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der veterinärmedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Hans Stöhr
aus
Pfaffenhofen/Aichach

München 1970

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Frau Prof. Dr. I. GYLSTORFF
Referent: Herr Prof. Dr. L. KOTTER
Korreferent: Herr Prof. Dr. A. MAYR

Tag der Promotion: 12. Februar 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

UNI-DRUCK, 8 München 13, Amalienstraße 85

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
A.	EINLEITUNG	1
B.	LITERATUR	2
I.	Vorkommen von Clostridien bei Schlachttieren	2
1.	Clostridieninfektionen bei Schlachttieren	2
2.	Auftreten von Clostridien in tierischen Produkten	3
II.	Clostridieninfektionen beim Menschen, bedingt durch Verzehr von infizierten Nahrungsmitteln tierischen Ursprungs	7
1.	Botulismus	8
2.	Cl.-perfringens-Lebensmittelintoxikationen	9
3.	Cl.-sporogenes-Lebensmittelvergiftung	11
III.	Maßnahmen zur Vermeidung und Bekämpfung von Clostridienerkrankungen	11
IV.	Züchtung und Nachweis von Clostridium-Spezies	12
1.	Züchtung und kultureller Nachweis	12
	a) Anaerobe und "aerobe" Züchtung von Clostridien	
	b) Selektivmedien zum kulturellen Nachweis	15
	c) Grund-Nährböden zum Anaerobennachweis	16
2.	Mikroskopischer Nachweis	18
3.	Serologischer Nachweis	19
4.	Tierversuch	19
V.	Differenzierung der Clostridium-Spezies	20

Seite

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN 23

I. Material und Methodik 23

1. Entnahme der Proben 23
2. Züchtung 23
3. Zielsetzung 23

II. Differenzierung 24

III. Versuchsbeschreibungen 27

1. Mikroskopische Untersuchung 27
2. Prüfung des Verhaltens in Lackmusmilch 27
3. Indolbildungsvermögen 28
4. Die "Zuckerreihe" 28
5. Gelatinehydrolyse 29
6. Beweglichkeitsprüfung 29
7. Haemolyse 30
8. Urease-Test 30
9. Stärke-Test 31

IV. Ergebnisse 31

1. Ergebnistabellen 32
2. Identifizierte Clostridienarten 35
3. Verteilung der Clostridiumspezies auf die Tierarten 36
4. Vergleichende Gegenüberstellung der Tierarten bezüglich der Verteilung der Clostridienspezies 38
5. Vergleichende Betrachtung über den Zusammenhang zwischen Auftreten von Clostridien und dem Vorbericht bzw. pathologisch-anatomischen Befund 39

Seite

D. DISKUSSION UND BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 43

I. Differenzierungsmethode 43

II. Differenzierte Stämme 43

III. Die Verteilung der Anaeroben auf die Tierarten 44

IV. Zusammenhänge zwischen dem Auftreten von Clostridien und dem Krankheitsbefund 45

V. Kritische Gedanken zur Praxis des Clostridiennachweises bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU) 46

VI. Eigene Verbesserungsvorschläge zum Clostridiennachweis 48

E. ZUSAMMENFASSUNG 49

F. LITERATURVERZEICHNIS 53

LEBENSLAUF

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548328_0010

A. EINLEITUNG

Clostridien sind anaerobe oder mikroaerophile, meist gram-positive, stäbchenförmige und sporenbildende Bakterien, die zum überwiegenden Teil durch peritriche Begeißelung beweglich sind. Sie gehören der Gruppe der Bacillaceae an (BERGEY (11), SKERMAN (127)). Von den bisher namentlich bekannten 93 Clostridienspezies entwickeln 60 eine saccharolytische und etwa 10 eine fleischhygienisch besonders beachtliche proteolytische Tätigkeit, während sich die restlichen nicht klar in eine der beiden Gruppen einordnen lassen (BERGEY (11), KUTZNER (84)). Einige der proteolytischen Arten können Fleischverderbnis oder sogar Lebensmittelintoxikationen oder -infektionen verursachen. Die Bedeutung dieser Keime wird noch dadurch erhöht, daß sie im Boden und im Intestinaltrakt von Mensch und Tier sehr verbreitet sind.

B. LITERATUR

I. VORKOMMEN VON CLOSTRIDIEN BEI SCHLACHTTIEREN

1. Clostridieninfektionen bei Schlachttieren

Clostridieninfektionen bei (Schlacht-)Tieren sind nicht selten. ESTOLA und STENBERG (32) führten bei 124 Sektionen den Tod in 22,5% der Fälle ganz oder teilweise auf Clostridieninfektionen zurück. Als Infektionsweg werden die verletzte oder unverletzte Haut und die Schleimhaut (Darmschleimhaut) angesehen (HAUPT (53)).

Cl. chauvoei (feseri) ruft "Rauschbrand" (Synonyma: "black leg", "symptomatic anthrax") bei Rindern und Schafen hervor (HAUPT (53)), das gleiche gilt für Cl. partum, Cl. sporogenes und Cl. toxinogenes (BERGEY (10)).

Cl. septicum gilt als der Erreger des "Pararauschbrandes" oder "malignen Ödems" von Rind und Schaf, des "Schur- und Kastrationsbrandes" der Schafe, des "Geburtsrauschbrandes" der Rinder und Schafe, des "Klassischen Bradsots" der Schafe und des "Gasgangräns" von Rind und Schaf nach Wundverletzungen (HAUPT (53)).

Cl. novyi (oedematiens) verursacht den "Deutschen Bradsot" der Schafe und die "black disease" der Rinder und Schafe (HAUPT (53), WILLIAMS (139), BATTY und Mitarbeiter (5)).

Dieser Keim ist nach BATTY und Mitarbeitern (5) auch die Ursache eines "plötzlichen Todes" ("sudden death") bei Schweinen.

Der Typ D von Cl. novyi wird von WILLIAMS (139) auch als Erreger einer Hämoglobinurie bei Rindern angesehen.

Ebenfalls eine Hämoglobinurie (HAUPT (53)) und Ikterohämoglobinurie (BERGEY (10)) verursacht Cl. haemolyticum.

Cl. perfringens (welchii) Typ B ruft die bösartige "Dysenterie" junger Lämmer und Kälber hervor (HAUPT (53)), der Typ C den "struck" (toxische Enteritis) bei Schafen (HAUPT (53), McLENNAN (97)) und jungen Lämmern (FINDLEY und BUNTAIN (36)) sowie die Enterotoxämie bei Ferkeln (HØGH (60)), der Typ D die infektiöse "Lämmerdysenterie", die auch bei Kälbern auftritt, Typ E die "Enterotoxämie" der Kälber (HAUPT (53), McLENNAN (97)) und der Typ F eine tödliche "Dysenterie" bei Ferkeln (HAUPT (53)). HEIDRICH und GROSSKLAUS (55) berichten über zwei Fälle von akuter Mastitis beim Rind, verursacht durch Cl. perfringens. BOZEMANN und Mitarbeiter (9) beschreiben eine Enterotoxämie bei mehreren jungen Ochsen, hervorgerufen durch Cl. perfringens. Die Verfasser nehmen an, daß dieser Keim öfter die Ursache plötzlicher Todesfälle (Krämpfe, Speichelfluß) ist, als das Schrifttum vermuten läßt.

Cl. botulinum ist für Mensch und Tier besonders gefährlich. Der Typ C führt zum "Botulismus" des Rindes (HAUPT (53), MÜLLER, J. (106), FRAZIER (40), MÜLLER, R. (107)). "Midland cattle disease" in Australien, auch "bulbar paralysis" (BERGEY (10)) genannt, und "Lamziekte" der Rinder in Südafrika (HAUPT (53), FRAZIER (40), BERGEY (10)) werden durch den Typ D hervorgerufen.

MANSSON und OLSSON (94) sehen für die Parakeratosis der Schweine einen Zusammenhang zwischen Clostridienmenge im Darm und proteinreicher Trockennahrung.

2. Auftreten von Clostridien in tierischen Produkten

Neben dem krankheitsbedingten Auftreten der Clostridien bei Tieren findet man sie auch im klinisch gesunden Organismus.

Zur Frage, auf welchem Weg Clostridien nicht krankheitsbedingt in Schlachttierteile und Nahrungsmittel tierischer Herkunft gelangen, gibt es mehrere Erklärungen. Für HOBBS und Mitarbeiter (58) findet die Invasion der Muskulatur vom Darmtrakt aus statt, und zwar intra vitam und post mortem. JENSEN und HESS (64) vertreten die Ansicht, daß die Gewebsinfektion meist erst agonal oder postmortal auftritt. BOYER (8) meint, daß die Clostridien im Fleisch im Moment des Schlachtens ausgestreut werden. Nach ULRICH und HALVORSON (137) gelangen die Keime von der Haut über den Zirku-

lationsapparat in das Gewebe. Weitere Infektionsmöglichkeiten sind Verschmutzungen beim Schlachten, etwa durch Verletzung des Intestinaltraktes, Bodenreinigung der Schlachthallen mittels Wasserstrahl und infizierte Wischtücher oder Arbeitskleidung (ELTER und SCHARNER (31)). Außerdem kann der Keim über Küchenpersonal, Metzger und Händler, Fliegen, Ratten- und Mäusekot und durch Straßenschmutz und Küchenstaub in Fleisch und Fleischprodukte gelangen (McKILLOP (96), LINZENMEIER (92), HOBBS und Mitarbeiter (58)).

Im Blut beschreibt BERGEY (10) das Vorkommen von Cl. haemolyticum. Cl. cellobioparus (10) und Cl. botulinum Typ C (SCHOOP (121)) wurden aus dem Pansen des Rindes und letztere Spezies auch aus dem des Kalbes isoliert. Im Labmagen fand sich Cl. omelanskii, im Darmtrakt Cl. proteolyticum (BERGEY (10)).

SCHOOP (121) wies im Dünndarm von Rind und Kalb Cl. botulinum Typ C nach, während HUET (62) Cl. sordelli aus dem Darmtrakt verschiedener Tiere isolieren konnte.

Bei 134 Kälber-Organproben mit Keimgehalt fand KNÖSEL (78) zweimal Cl. perfringens. In der Leber wurde Cl. botulinum Typ C (Rind) nachgewiesen (MÜLLER, J. (105)), ebenso Cl. perfringens Typ A in 26% der Rinderlebern im Handel und in 12% der Lebern frisch geschlachteter Tiere (CANADA, STRONG (18)). HALL und ANGELOTTI (46) isolierten denselben Erreger aus Leber, Niere und Knochen von Schlachttieren. KELCH (70) entdeckte in 13 von 35 Leberproben obligate Anaerobier, während KERRY (74) Cl. chauvoei (feseri) in 8 von 50 Lebern und in 10 von 50 Milzen von gesunden Ochsen nachwies.
Clostridien auf der Haut fand man besonders bei Schweinen. Dort isolierte JENSEN (63) vor allem Cl. sporogenes, Cl. putrefaciens und Cl. histolyticum.
Im Euter wird das Vorkommen von Cl. perfringens beschrieben (HEIDRICH, GROSSKLAUS (55)).
Wichtig ist noch das Vorkommen von Clostridien in Fleisch und Fleischerzeugnissen, da dadurch leicht Lebensmittelvergiftungen entstehen können. HALL und ANGELOTTI (46) ermittelten an Hand von 162 rohen Fleischproben, daß Kalbfleisch zu 82%, Rindfleisch zu 70% und Schweinefleisch zu 37% mit Cl. perfringens verunreinigt war. STRONG und Mitarbeiter (131) isolierten Cl. perfringens aus 16,4% der rohen Fleischproben, darun-

ter 9 Hackfleischproben, von denen 4 positiv waren. HOBBS und WILSON (59) fanden 10,5 - 35% des Fleisches aus dem Handel mit Cl. perfringens infiziert, und zwar mit hitzeresistenten Sporen.

BERGEY (10) erwähnt das Vorkommen von Cl. carnis und Cl. solidum in Rind- und Cl. putrefaciens in Schweinefleisch. Das Auftreten von fäulniserregenden anaeroben Sporen in frischem Fleisch ist nach BURKE und Mitarbeitern (16), STEINKRAUS und AYRES (130) und HARRIMAN und Mitarbeitern (51) wiederum gering. In gekochtem und gebratenem Fleisch wird fast nur das Auftreten von Cl. perfringens beschrieben. Man fand diese Spezies in Roastbeef (BROWNE und Mitarbeiter (14), ANGELOTTI und Mitarbeiter (3)), in aufgewärmten und kalten Braten- und Fleischgerichten (HOBBS (57)), in wiedererhitztem, gebratenem, gekochtem und gedünstetem (HOBBS und Mitarbeiter (58)) und (an-)gebratenem Fleisch (LINZENMEIER (92), McKILLOP (96)).

In gefrorenen Lebensmitteln isolierten STRONG und Mitarbeiter Cl. perfringens, während JENSEN (63) Cl. sporogenes in falsch gekühltem Rindfleisch fand. Von 28 Würzfleischproben waren nach Untersuchungen von STRONG und Mitarbeitern (131) 5 mit Cl. perfringens infiziert. SKULBERG (128) wies Botulinus-Toxin Typ B in gesalzenem, geräuchertem Schinken und gesalzenem Ochsenfleisch nach. Der Anteil von putrifizierenden anaeroben Sporen in Pökelfleisch ist nach HARRIMAN und Mitarbeitern (51) unbedeutend.

In verdorbenem (faulem) Fleisch fand man Cl. ovalare, Cl. lentoputrescens, Cl. solidum, Cl. sporogenes, Cl. putrefaciens (BERGEY (10)) und Cl. bifermentans (BERGEY (10), HAUPT (53)).

In Schweine-Fett stellte NIKODÉMUSZ (109) einen Cl.-perfringens-Keimgehalt von 600 000/g fest.

Wurstwaren sind häufig mit Clostridien infiziert. Cl. botulinum entdeckte man in Koch- und Brühwürsten (LERCHE und Mitarbeiter (88)), in Leberwurst (MOCHMANN und ZIEGLER (99)) und in Preßwurst (NIKODÉMUSZ und Mitarbeiter (111)). In 38 ungekochten Wurstproben fand McKILLOP (96) 36 hämolytische, 9 nicht hämolytische Stämme und einen hitzeresistenten Stamm von Cl. perfringens und in 25 gekochten Würsten 4 hämolytische und einen nicht hämolytischen Cl.-perfringens-Keim. In Schweins-

und Mettwürsten herrschte nach HALL und ANGELOTTI (46) ein Cl.-perfringens-Befall von 47,6%. In Preßwurst ermittelte NIKODÉMUSZ (109) eine Cl.-perfringens-Keimzahl von 8000/g. Untersuchungen von SINELL und LEVETZOW (125) ergaben, daß in 38 von 128 vorverpackten Wurstproben (besonders Brüh- und Rohwürste) sulfitreduzierende Clostridien, vor allem Cl. perfringens, Cl. sporogenes, Cl. bifermentans, Cl. butyricum und Cl. parasporogenes in Keimzahlen von 10 - 100/g zu finden waren.

ELTER und SCHARNER (31) fanden bei 957 Rohwürsten 22,9% und bei 267 genußreifen, 15 Tage alten Rohwürsten noch 4,1% mit vermehrungsfähigen Cl.-perfringens-Keimen behaftet. Von 157 Blut-, 122 Leber- und 178 Brühwürsten enthielten 21,1%, 18,9% bzw. 17,4% Cl. perfringens. Davon hatten 32,9% der positiven Blutwurst- und 27,3% der positiven Leberwurstproben mehr als 100 Keime/g.

BURBIANKA (15) isolierte aus 50 Wurstproben 77 Stämme sporenbildender Anaerobier, insbesondere Cl. perfringens, Cl. bifermentans, Cl. carnofoetidum und Cl. sporogenes. Grütz- und Leberwürste waren am meisten infiziert. BERGEY (10) erwähnt das Vorkommen von Cl. mucosum in Blutwurst.

In Konserven verursachen Clostridien meist Bombagen. LERCHE und Mitarbeiter (88) berichten über das Vorkommen von Cl. botulinum in eingewecktem Schweinefleisch und in Dosenfleischwaren. Nach BERGEY (10) kommt der Botulinus-Typ A in Dosen vor, ebenso wie Cl. parabotulinum und Cl. thermosaccharolyticum. ZELLER und RENZ (149) stellten in 3 Fällen eine durch hohen Cl.-perfringens-Keimgehalt hervorgerufene Gärung von Leberwurstbrät in der Dose fest, und LEISTNER (86) behauptet, daß Cl. perfringens zu 60% die Ursache von Bombagen ist, die oft die Dichte einer Bouillonkultur (10^8 - 10^9 Keime/g) besitzen. Auch Cl. sporogenes wird als Erzeuger von Bombagen erwähnt (LERCHE und Mitarbeiter (88), NIKODÉMUSZ (109)). STEINKRAUS und AYRES (130) fanden einen nur geringen Sporenbefall (0,2 - 2 Sp./g) in eingedostem Luncheonmeat vom Schwein.

Auch in anderen Fertigwaren und Fleischgerichten wurde die Existenz von Clostridien nachgewiesen. So waren bei SINELL und LEVETZOW (125) 2 von 22 Packungen mit Räucherwaren und eine von 2 luftgetrockneten Wa-

ren mit sulfitreduzierenden Clostridien behaftet, sie (126) ermittelten auch Cl. perfringens in Prager Schinken und in Kasseler. Nach Untersuchungen von HALL und ANGELOTTI (46) über Cl. perfringens in Fleisch und Fleischprodukten war der Keimgehalt in Sandwichfleisch und -aufstrich (sogenanntes "Schnelleßfleisch") mit 4,7% noch am geringsten. HOBBS (57) stellte in vorgekochten Fleischgerichten eine fast völlige Reinkultur von nicht hämolytischen, hitzeresistenten Cl.-perfringens-Keimen fest. McKILLOP (96) fand Cl. perfringens in 6 von 9 Steakproben.

Cl. botulinum kommt in Speck und Fleischpasteten (LERCHE und Mitarbeiter (88)) und in Schinken (LERCHE und Mitarbeiter (88), MOCHMANN und ZIEGLER (99)) vor, und zwar sowohl in geräuchertem (SKULBERG (128)) als auch in rohem (ZELLER (148)). RALOVICH und BARNA (116) isolierten aus Hausmacherschinken Cl. botulinum Typ B. Ebenfalls in Schinken fand man Cl. flabelliferum (BERGEY (10)) und Cl. putrefaciens (FRAZIER (40)).

II. CLOSTRIDIENINFEKTION BEIM MENSCHEN, BEDINGT DURCH VERZEHR VON INFIZIERTEN NAHRUNGSMITTELN TIERISCHEN URSPRUNGS

Durch Genuß von Clostridien-infizierten Lebensmitteln, etwa der vorhin beschriebenen Fleischerzeugnisse, kann es beim Menschen zu Einzel-, Gruppen- oder Massenerkrankungen kommen.

Eine bakterielle Lebensmittelvergiftung kann man in zwei Grundkategorien einteilen (DACK (21)):

1. Vergiftung durch Vermehrung von Erregern und Absonderung eines Exotoxins wie bei Botulismus (und Staphylokokken).

2. Erkrankung durch Vermehrung der Erreger in Nahrungsmitteln in erheblichen Mengen (Freiwerden eines Endotoxins) wie bei Cl. perfringens und Salmonellen.

1. Botulismus

Das Cl. botulinum nannte man früher "Wurstvergifter", da vor allem Erkrankungen nach Genuß von hausgemachter Wurst und hausgemachten, "eingeweckten", schwach sauren Lebensmitteln (MOSSEL (101)) auftraten. Das Ektotoxin oder besser Neurotoxin, da es wahrscheinlich die Produktion von Azetylcholin hemmt (JENSEN (63)), ist das stärkste bekannte bakterielle Gift (LERCHE und Mitarbeiter (88)). Beim Menschen rufen die Typen A und B (Typ B besonders in Ländern mit landwirtschaftlich genutzten Böden (ZELLER (148))) und der psychrophile (LEWIS, CASSEL (91)) Typ E, der sich vornehmlich im Fisch findet (DOLMAN (25)), Botulismus hervor (FRAZIER (40)).

Die Inkubationszeit bei Botulismus beträgt 12 - 48 Std. (JENSEN (63)) bzw. 18 - 36 Std. (LERCHE (88)). Die Symptome sind Übelkeit, Erbrechen, Schwindelgefühle, Kopfschmerzen (JENSEN (63), LERCHE (88)), manchmal Magen- und Darmbeschwerden und Ziehen in den Gliedern (LERCHE und Mitarbeiter (88)). Später treten die charakteristischen Botulismussymptome auf: Sehstörungen (JENSEN (63)), Schluck- und Sprechbeschwerden, heisere Stimme, trockene Schleimhäute, Erstickungsanfälle, Ohrensausen und verschiedene Lähmungserscheinungen, also das Bild einer Bulbärparalyse. Schon nach 48 Std. kann der Tod eintreten (LERCHE und Mitarbeiter (88)). Die Mortalität beträgt in den USA 65%, in Europa 20% (FRAZIER (40)).

Nach einer Statistik des Reichsgesundheitsamtes für den Zeitraum von 1935 - 1949 nahmen die Fälle von Botulismus ständig zu. Insgesamt sind für diesen Zeitraum 80 Todesfälle erfaßt (LERCHE und Mitarbeiter (88)). Kurz nach dem 2. Weltkrieg wurden noch mehrere Botulismusfälle bekannt, seitdem konnte eine ständige Abnahme notiert werden (MOCHMANN, ZIEGLER (99)). In den USA treten jährlich noch einige hundert Fälle auf (LEWIS, CASSEL (91)). Nach Ansicht von DACK (21) ist Botulismus jedoch selten, er glaubt, daß oft Vergiftungen durch Insektizide und septische Meningitiden damit verwechselt werden.

MOCHMANN und ZIEGLER (99) berichteten 1963 von 3 Einzelerkrankungen durch infizierte Leberwurst, Schinken und Gänsebrust mit klinisch typischem Verlauf, wobei zwei einen tödlichen Ausgang nahmen, weiterhin schildern sie eine Botulismus-Gruppenerkrankung (4 Personen) mit

atypischem Verlauf. SKULBERG (128) beschrieb 1961 10 in Norwegen festgestellte Botulismusausbrüche bei insgesamt 53 Personen. In 44 Fällen wurde das Toxin des Typ B in gesalzenem, geräuchertem Schinken und in gesalzenem Ochsenfleisch gefunden. RALOVICH und BARNA (116) berichten von 2 Botulismus-B-Erkrankungen, hervorgerufen durch infizierten Schinken.

2. Cl.-perfringens-Lebensmittelintoxikationen

Ein weiterer Erreger von Lebensmittelvergiftungen ist Cl. perfringens und hier vor allem der hitzeresistente Typ A. Nach ausländischen Angaben steigt die Zahl der Cl.-perfringens-Intoxikationen jährlich (NIKODÉMUSZ (109)). Diese Erkrankung tritt häufiger als Botulismus und in Form von Massenausbrüchen auf. Außerdem ist die Keimzahl/g entscheidend (LERCHE und Mitarbeiter (88)). Erst ein Keimgehalt von 10^5 - 10^6 soll gesundheitsschädigend sein (MOSSEL (101), SINELL und LEVETZOW (126)).

Die Inkubationszeit beträgt 3 - 22 Std. (NIKODÉMUSZ (109), DACK (21), CANADA und STRONG (18), LINZENMEIER (92)). Nach leichtem klinischen Verlauf mit Bauchschmerzen, Durchfall, gelegentlichem Erbrechen, Kopfschmerzen, Fieber und Übelkeit (NIKODÉMUSZ (109), CANADA und STRONG (18)) klingt die Krankheit nach ein (CANADA und STRONG (18)) bis zwei Tagen (NIKODÉMUSZ (109)) ab.

Cl.-perfringens-Massenausbrüche werden besonders aus England beschrieben (HOBBS (58), WILLIS (140)). Schon 1943 berichteten KNOX und MacDONALD (79) und 1944 DUNCAN (27) von Cl.-perfringens-Lebensmittelvergiftungen in England. Es handelte sich um einen atypischen Typ A. COCKBURN und VERNON (20) ermittelten an Hand von Lebensmittelvergiftungen in England und Wales, daß 12% der Massenausbrüche und 1% der Familienerkrankungen durch Cl. perfringens verursacht wurden. Das ist ein relativ hoher Prozentsatz, wenn man bedenkt, daß 25 - 48,5% der Lebensmittelvergiftungen, insbesondere der "unspezifischen" wie Cl.-perfringens-Erkrankungen, ungeklärt bleiben (NIKODÉMUSZ und Mitarbeiter (110)). HOBBS und Mitarbeiter (58) berichten von 18 Perfringens-Typ-A-Ausbrüchen (4 bis 316 Personen betroffen) im Zeitraum von 1949 - 1952.

Aus den USA beschrieben 1960 HART und Mitarbeiter (52) eine Cl.-perfringens-Typ-A-Vergiftung mit denselben klinischen Symptomen wie bei englischen Ausbrüchen.

KLATT (75) stellte bei 22 Lebensmittelvergiftungen in Finnland in 45% der Fälle Cl. perfringens als Erreger fest. Ursache war zu langsame Abkühlung der Mahlzeiten und erneutes Aufwärmen.

LINZENMEIER (92) beschreibt eine Lebensmittelvergiftung durch den thermoresistenten Cl. perfringens Typ A, wobei 300 von 390 Personen erkrankten. SINELL und LEVETZOW (126) klärten 4 Fälle von Cl.-perfringens-Intoxikationen. (Ursache waren Kasseler, Prager Schinken, Geflügelragout und Pute.) NIKODÉMUSZ (109) berichtet von zwei Vergiftungsfällen, und BROWNE und Mitarbeiter (14) ermittelten in ungenügend erhitztem Roastbeef Cl. perfringens und Enterokokken als Erreger einer Fleischvergiftung. In letzter Zeit berichteten MURELL und Mitarbeiter (108) über ein epidemieartiges Auftreten von Cl.-perfringens-Enterotoxämien mit 50%iger Mortalität unter den Eingeborenen Neu-Guineas. Hervorgerufen wurde diese durch Darmgangrän gekennzeichnete schwere Lebensmittelvergiftung ("pigbel-syndrom") durch infiziertes Schweinefleisch, das bei Stammesfeiern verzehrt wird.

Vor allem wird bei der Besprechung der Ätiologie von Cl.-perfringens-Lebensmittelvergiftungen hingewiesen, daß nicht genügend erhitzte und langsam abgekühlte Fleischgerichte, die tags darauf zum Verzehr wiedererhitzt werden, die Hauptursache dieser Intoxikationen sind (BROWNE und Mitarbeiter (14), HOBBS und Mitarbeiter (58), LINZENMEIER (92), HOBBS (57), COCKBURN und VERNON (20), KLATT (75), ANGELOTTI und Mitarbeiter (3)). Vorkochen und langsames Abkühlen fördern die Clostridienentwicklung in hohem Maße (ANGELOTTI und Mitarbeiter (3)), insbesondere, da es sich meist um thermoresistente Sporen und Keime vom Typ A handelt, die einem Kochen von 1 - 3 Std. widerstehen können (HOBBS und WILSON (59)).

Die Auslösung von enterotoxischen Nahrungsmittelvergiftungen durch Cl. perfringens ist nach Untersuchungen von DE RIU (23) häufig auf das Vorhandensein von Dauerausscheidern zurückzuführen. Bei 550 Personen, hauptsächlich aus geschlossenen Personenkreisen (Altersheimen, Kasernen), wurde an Hand von Stuhlproben ein Keimträgertum von 9,45% ermittelt.

SUTTON (133) stellte bei Personen mit Cl.-perfringens-Fleischvergiftung eine signifikante Erhöhung dieser Keime im Stuhl fest.

Da Cl. perfringens ein normaler Darmbewohner ist, wurden Cl.-perfringens-Lebensmittelvergiftungen bezweifelt. In Freiwilligenversuchen gelang es, eine Nahrungsmittelvergiftung nachzuahmen (HAUSCHILD und THATCHER (54)), allerdings nur mit Kulturen, nie aber mit Kulturfiltraten (HOBBS und Mitarbeiter (58), DISCHE und ELEK (24)). Somit scheidet die Annahme eines in Lebensmitteln vorgebildeten (thermostabilen) Toxins aus (LINZENMEIER (92)). Nach NYGREN (113) ruft das Phosphorylcholin in Cl. perfringens die Vergiftungen hervor.

3. Cl.-sporogenes-Lebensmittelvergiftung

Über eine Cl.-sporogenes-Vergiftung durch infiziertes Dosen- bzw. falsch gekühltes Rindfleisch berichten LERCHE und Mitarbeiter (88) bzw. JENSEN (63).

III. MASSNAHMEN ZUR VERMEIDUNG UND BEKÄMPFUNG VON CLOSTRIDIENERKRANKUNGEN

Zur Vermeidung von Cl.-perfringens-Intoxikationen durch aufgewärmte Fleischgerichte empfehlen HOBBS und Mitarbeiter (58) und LINZENMEIER (92) ein rasches Abkühlen von vorgekochten Lebensmitteln.

Aerobe Verhältnisse, niedriger pH-Wert und niedriger Wassergehalt (LERCHE und Mitarbeiter (88)) können das Clostridienwachstum ebenso verhindern wie Salze und Pökelingredientien (ULRICH und HALVORSON (137), HANSEN und RIEMANN (50)). Dieser hemmende Effekt von Salzen beruht auf deren toxischer Wirkung, der Zelldehydration und der Plasmolyse der Bakterienzelle (FABIAN (34)). Entgegen diesen Feststellungen konnte sich nach CHRISTIANSEN und FOSTER (19) Cl. botulinum in (vakuumverpacktem) Pökelfleisch entwickeln. Eine Konkurrenzflora in Form von Fäuliskeimen, Fäkalstreptokokken (in Dosenschinken), Coliformen, Laktobazillen, Bac. subtilis, Proteus vulgaris usw. kann durch pH-Wertsenkung und Antagonis-

mus (LEISTNER (87)) das Clostridienwachstum in Lebensmitteln verhindern (ELLIOTT und MICHENER (29), BORGSTROM (7)).

Zur Verhütung von Botulismus sind in den USA Erhitzungszeiten für Konserven zur sicheren Abtötung der resistenten Sporen vorgeschrieben (ESTY und MEYER (33)). LERCHE und Mitarbeiter geben für die Typen A und B Erhitzungszeiten von 4 - 5 Std. bei 121°C und für Sporen des Typs C 3 - 75 Min. bei 105°C an. Nach JENSEN (63) sind, ähnlich wie nach STUMBO und Mitarbeitern (132), 30 Min. bei 100°C ausreichend, während FRAZIER (40) 100 - 330 Min. bei 100°C für notwendig hält.

Auch Gamma-Bestrahlung zur Sporenabtötung wurde durchgeführt (KEMPE und GRAIKOSKI (73), FRAZIER (40), KOCH und ANELLIS (81)). Ein von VIERLING (138) zur Bekämpfung von Botulismus vorgenommener Antibiotika-Resistenztest ergab eine weitgehende Antibiotika-Resistenz mit Ausnahme von Penicillin.

IV. ZÜCHTUNG UND NACHWEIS VON CLOSTRIDIUM-SPEZIES

1. Züchtung und kultureller Nachweis

a) Anaerobe und "aerobe" Züchtung von Clostridien

Die Clostridien können in verschiedenen Kulturgefäßen gezüchtet werden. Bei der Kultivierung auf Platten (Petri- oder Brewer-Schale) werden feste Nährböden verwendet. In Röhrchen - einfache oder nach BURRI (17), aus denen man die Agarsäule durch Abnehmen eines Verschlusses an der Basis herausnehmen kann - können flüssige, feste und halbfeste Medien zugegeben werden und zwar in Form von festem Schrägagar (Oberflächenkultur), in hoher Agarschicht (Schüttelkultur), die den Vorteil benutzt, daß man keine sauerstofffreie Atmosphäre benötigt (KUTZNER (84)), in hoher Flüssigkeitsschicht mit luftdichtem Verschluß, in flüssigem Medium mit festen Bestandteilen (z. B. Leberstückchen) (84) oder in Form von halbfesten Medien mit 0,25% Agar (SPRAY (129)). Als drittes Kulturgefäß ist die von BLADEL und GREENBERG (6) und GREENBERG und Mitarbeiter (43) beschriebene Plastikfolientasche zu erwähnen. Dabei werden zwei handtellergroße

Folien in runder Form ausgestanzt, an den Rändern zusammengepreßt und dann mit dem Medium gefüllt. Für die Herstellung dieser Folientaschen benötigt man allerdings viel Zeit, auch dürfte das Abimpfen aus diesen Folientaschen unter sterilen Verhältnissen schwieriger sein als bei Röhrchen.

Die Petrischalen haben in der Anaerobenzüchtung den Nachteil, daß sie mehr Platz in Anspruch nehmen als Röhrchen, daß man nicht so steril arbeiten kann wie mit diesen und daß man fast immer Anaerobengefäße zum Bebrüten benötigt, während die kleinlumigen Röhrchen bei hoher Füllung mit flüssigem oder halbfestem Nährmedium schon eine gewisse Anaerobiosis bieten.

Zum Clostridiennachweis ist der Ausschluß des atmosphärischen Sauerstoffes Voraussetzung. Diese anaerobe Züchtung kann nach verschiedenen Methoden erfolgen, z. B. durch Tilgung des Sauerstoffes durch Verwendung von sauerstoffzehrenden Mikroorganismen. Nach FORTNER (38) wird das Medium in der Petrischale in zwei Teile geteilt. Den ersten Teil verwendet man für das Untersuchungsmaterial, auf die zweite Hälfte gibt man Sauerstoffzehrer wie Serratia marcescens, die anaerobe Verhältnisse schaffen. Den Verschluß bildet eine Glasschale mit Plastilinabdichtung. 1932 verbesserten JUSATZ und KLEINSORGEN (76) das Fortnersche Verfahren durch Einbringen eines Zelluloseringes zum Aufsaugen von Kondenswasser und durch einen Druckklammerverschluß, und 1933 modifizierte JUSATZ (65) das Verfahren weiter, indem er die Sauerstoffzehrer und das Untersuchungsmaterial auf zwei getrennte Schalen brachte und so mehr Platz zur Untersuchung schuf. Die Abdichtung bildeten Gummiringe. 1936 gab es eine weitere Modifikation durch SCHOOP (120), der zwischen die beiden Schalen noch eine Glasplatte mit zentralem Loch einfügte und das Ganze mit Plastilinstreifen verschloß.

Man kann Anaerobiosis auch durch Evakuieren des Sauerstoffes erreichen. So führte ZEISSLER (146) die Bebrütung der Platten in einem evakuierten Gefäß durch (sog. MAASSENscher Apparat). Zur Abdichtung dient Fett. SCHMIDT (119) führte die Evakuierung in Weckgläsern mit Gummiringverschluß aus, und GUTHOF (44) evakuierte gewöhnliche Petrischalen mit runder Glasplatte als Verschluß und Gummiringen zur Abdichtung. Dieses Verfahren hat den Vorteil, daß das Vakuum in dem kleinen Raum der Petrischale lang erhalten bleibt (KELCH (71)). Nach GUTHOF (44) hat sich ein kombiniertes Verfahren mit Evakuieren und Sauerstoffzehrern bewährt.

Weiterhin kann man den Luftsauerstoff physikalisch verdrängen durch Einleiten von indifferenten Gasen wie H_2, N_2 (HALLMANN (48), KUTZNER (84)), Helium oder Leuchtgas (84) oder auf chemische Weise durch Zugabe von Pyrogallol und Na_2CO_3 (KOCH (80)), Pyrogallol und Kalilauge (ZEISSLER (146)) oder Phosphor (KUTZNER (84)).

Der Nachteil des Evakuierens und Einleitens von Gasen ist der, daß man Kulturen, die nur durch solche Behandlungsverfahren wachsen, nicht bei normalen Zimmerverhältnissen bebrüten oder aufbewahren kann und die Geräte für diese Methode finanzielle und räumliche Nachteile bieten.

Auch der Zusatz reduzierender chemischer Substanzen und bestimmter tierischer und pflanzlicher Organe drückt das Redoxpotential der Nährböden und wirkt dem Wiederanstieg durch Unschädlichmachung des Luftsauerstoffes entgegen (HALLMANN (48)). Der Luftsauerstoff muß aber vorher z. B. durch Erhitzen im Wasserbad weitgehend entfernt werden. Zu diesen Substanzen gehören Glukose, Na-Formiat, Na_2SO_3 (HALLMANN (48)) reduziertes Eisen, 1-Askorbinsäure, SH-Körper wie Cystein, Glutathion und Thioglykolsäure (EHRISMANN (28), HALLMANN (48). Die Wirkung besteht nach EHRISMANN (28) in der Verschiebung des Redoxpotentials nach der negativen Seite und/oder in einer Zerstörung von Wasserstoffsuperoxyd.

Natürliche Redoxsysteme sind z. B. Leberstückchen (TAROZZI (135), WILSON und BLAIR (142), KELCH (69)), Hirnteile (HALLMANN (48)), Kartoffelstückchen oder keimender Samen (KUTZNER (84)).

Eine "aerobe Kultivierung" von Cl. tetani gelang DEDIC und KOCH (22) durch Zugabe von 0,4 μg Co^{++} (Kobalt). Da die Reduktion in den Zellen stattfindet, soll es möglich sein, die obligat anaeroben Keime unter aeroben Verhältnissen zu züchten.

Der Zusatz reduzierender chemischer oder tierisch-pflanzlicher Substanzen zur "aeroben" Bebrütung der Clostridien ist eine einfache und brauchbare Methode. Man kann die reduzierenden Substanzen zusammen mit dem Nährmedium abfüllen und benötigt bei Abfüllung in hoher Schicht in Röhrchen keine besonderen anaeroben äußeren Verhältnisse.

"Aerobe Bebrütung" von Anaeroben soll auch möglich sein durch Auflegen einer (transparenten) sauerstoffundurchlässigen Plastikfolie auf die beimpfte

Agaroberfläche der Platte (KNETEMANN (77), SHANK (124)).

Ebenfalls als Sauerstoffsperre fungiert ein steriler Paraffinüberzug über die Agaroberfläche (LEISTNER (85), STEINKRAUS und AYRES (130)) oder bei Röhrchenkulturen ein Vaspar-Verschluß (KUTZNER (84)). Denselben Effekt soll die Überschichtungsplatte nach LEISTNER (85) bringen. Über der beimpften Oberfläche wird nochmals eine Deckschicht aus demselben Material gegossen und nach dem Erstarren mit Paraffin luftdicht überzogen. Zur Überprüfung der Sauerstofffreiheit dienen Indikatoren wie Methylenblau (FILDES (35)) oder Neutralrot (HALLMANN (48)).

b) Selektivmedien zum kulturellen Nachweis

Beim kulturellen Nachweis von Clostridien ist neben der Anaerobiosis die Unterdrückung oder Hemmung der Begleitflora wichtig, ohne dabei das Wachstum der Clostridien zu stören.

Dies kann man erreichen, indem man den Nährböden Na-Sulfit oder Ferrichlorid zusetzt. Dies ist z. B. der Fall beim Nährboden nach WILSON und BLAIR (142) (wobei Sulfid und Eisen bei Cl. perfringens schon nach 6 - 7 Std. eine Schwärzung ergeben), bei den Medien nach TAKÁCS und NARAYAN (134), PUT (115), MOSSEL (101), MOSSEL und KROL (104), MOSCHELL (100), LEVETZOW (90), SINELL und LEVETZOW (126) und ANGELOTTI und Mitarbeitern (3) (Sulfit-Polymyxin-Sulphadiazin-Agar).

Nach LEVETZOW reduzieren 96% der Clostridiumspezies Sulfit und Eisen, so daß sich die Kolonien schwarz färben (TAKÁCS und NARAYAN (134)). Nach PRÉVOT (114) können nur Clostridien und Salmonellen Sulfit reduzieren, doch wurden noch andere Keime ermittelt, die dies vermögen, so z. B. Proteus (SINELL und LEVETZOW (126), ANGELOTTI und Mitarbeiter (3)), Escherichia freundii, Paracolobactrum und bestimmte Spezies von Erwinia, Flavobacterium und Acinetobacter (ANGELOTTI und Mitarbeiter (3)). Es müssen daher noch weitere Hemmstoffe (Selektivstoffe) zugegeben werden, um andere sulfitreduzierende Keime auszuschalten.

Zu diesen gehört Na-Azid (0,02%) (SINELL und LEVETZOW (126)). Es hemmt gramnegative Stäbchen und fakultativ anaerobe Bazillen, doch bleiben die katalase-negativen Bakterien (Clostridium, Lactobacillaceae) unberührt (YORK und VAUGHN (145)). Die Clostridien selbst werden bei

einer Konzentration von 0,015% überhaupt nicht oder nur sehr gering gehemmt (LEVETZOW (89)). 0,05% Na-Azid in Trypticase-Soja-Bouillon zeigt nach FORGET und FREDETTE (37) gegenüber allen aeroben Bakterien außer S. aureus eine bakteriostatische Wirkung.

Auch Kristallviolett hat gute selektive Eigenschaften, da es sowohl aerobe Sporenbildner als auch die gramnegative Flora hemmt. Dies ist wichtig, weil in beiden Gruppen einige Spezies Sulfit reduzieren können (LEVETZOW (89)).

Als weitere Selektivstoffe sind noch zu erwähnen Neomycin (WILLIS und HOBBS (141), SINELL und LEVETZOW (126)) und Polymyxin (ANGELOTTI und Mitarbeiter (4)), die Enterobacteriaceen unterdrücken, weiterhin Chloralhydrat (0,1%) (KUTZNER (84)), Sorbinsäure (KRAUS (82)) und Ascorbinsäure (EHRISMANN (28)), die aerobe Sporenbildner, nicht aber die katalase-negativen Lactobacillaceae unterdrücken (YORK und VAUGHN (145)). Thioglykolat als Reduktionsmittel und Selektivsubstanz zur Unterdrückung der Begleitflora ist zur Clostridienzüchtung sehr geeignet und wird deshalb in vielen Nährböden verwendet, z. B. im Medium nach BREWER (13), REED und ORR (117), McCLUNG (95), HALL und ANGELOTTI (46) (flüssiges Thioglykolatmedium), LINDEN (130) und SHANK (124). Neben Thioglykolat enthält das SAT-Medium nach LEVETZOW (89) auch Na-Azid und -Sulfit und ist als Ersatz der Leberbrühe nach KELCH für die BU gedacht, doch ist die Herstellung aufwendiger.
Das Erhitzen der Nährböden nach dem Beimpfen hat keinen oder einen nur mangelnden selektiven Effekt (HEPP (56), LEVETZOW (90)). Außerdem werden die noch nicht sporulierten Clostridienzellen vernichtet (MOSSEL (101)).

c) Grund-Nährböden zum Anaerobennachweis

Als Grund-Nährböden, möglichst mit Zusatz von Redox- und Selektivstoffen, empfehlen sich z. B. Medien mit Traubenzucker- und Blutzusatz. Blut ist gerade für anspruchsvolle Bakterien wachstumsfördernd. Traubenzucker wirkt auch als Energiequelle, doch wird er manchmal vergoren und stört durch Gasbildung. Blutzusatz enthalten die FORTNER (38) Blutplatte, ein Nähragar mit 10% Schafsblut, die ZEISSLERsche (146) Traubenzuckerblutagarplatte (Dextroseagar mit 25% defibriniertem Blut), die Blutplatte nach SCHMIDT (119) (Traubenzuckeragar mit Schafsblut) und nach KOCH (80) (mit 5% Schafsblut).

Leber dient als Redoxsystem in ROOTS' (118) Traubenzucker-Blut-Leberagarplatte. ROOTS fand, daß die Leistungsfähigkeit der oben beschriebenen Nährböden durch Zusatz von Leberbestandteilen erheblich gesteigert wird. Aber auch ohne Traubenzuckerzusatz ist dieser Nährboden nach ROOTS (118) zur Kultivierung von Anaeroben geeignet. Der Vorteil der Blutplatten ist der, daß die anspruchsvollen Clostridien gut auf ihnen wachsen; nachteilig ist, daß man die Platten meist anaerob bebrüten muß, des weiteren ist die sterile Gewinnung von Blut nicht immer leicht.

Wie schon erwähnt, besitzen Leber, Hirn und Fleisch reduzierende Eigenschaften und sind auch zur Züchtung in Röhrchen verwendbar, weshalb sie für die Anaerobenzüchtung geeignet sind. TAROZZI (135) beschrieb 1905 die Rezeptur einer Leberbouillon mit Leberstückchen, die nach Versuchen von WOHLFAHRT (143) und HEPP (56) dem Traubenzucker-Agar in hoher Schicht überlegen war.

Von den Nährböden mit Leberzusatz sind noch zu erwähnen die Leberbouillon nach FORTNER (38), der Leberagar nach LEISTNER (85), die Lebermilch (HALLMANN (48)) (mit Vollmilch anstelle von Fleischbouillon, die auf der Oberfläche eine luftundurchlässige Rahmschicht bildet) und die Leberbrühe nach KELCH (69).

Letztgenanntes Medium, das nach Ansicht des Verfassers gegenüber der Leberbouillon ein stärkeres Wachstum der Anaeroben gewährleistet, ist in der BRD zum Anaerobennachweis bei der BU vorgeschrieben. Der Autor selbst (71) modifizierte die Leberbrühe noch durch Zusatz von 2% Agar und 2% Pepton.

KRAUS (82) veränderte die Leberbrühe nach KELCH durch Sorbinsäurezusatz (0,12%) unter Weglassen von Na-Phosphat, so daß in jedem Fall innerhalb von 24 Std. das Wachstum von Clostridien gut erkennbar sein soll.

Neben den Redoxeigenschaften von Hirnbrei tritt noch durch H_2S-Bildung eine Eisensulfid-Schwärzung mit den organischen Eisenverbindungen desselben ein, was die Diagnose der Clostridien erleichtert. Solche Hirnnährböden sind z. B. der Hirnbrei nach HIBLER (aus HALLMANN (48)) und das halbfeste Hirnmedium nach SPRAY (129).

Fleisch, wegen der reduzierenden Eigenschaften und der guten Wachstumsmöglichkeiten für Clostridien ein brauchbarer Bestandteil von Nährböden, wird in ROBERTSON's Fleischbrühe (aus KERRY (74)), in NOYE's Kalbsbrühe (aus ANGELOTTI und Mitarbeiter (3)), im Schweinefleischbouillon nach ULRICH und HALVORSON (137) und im Rinderherz-Medium von STUMBO und Mitarbeitern (132) verwendet.

Eiweiß in anderer Form als Fleisch haben die Nährböden nach ACHALME (1) (Eiweißnährmedium aus gekochtem Hühnereiweiß) und nach WILLIS und HOBBS (141) (Laktose-Eigelb-Milch-Agar).

Hefeextrakt als Ersatz für Leberbrühe empfehlen WYNNE und Mitarbeiter (144) und FRANK und CAMPBELL (39). Hefeextrakt-Stärke-Medien sind zum Nachweis von Lebensmittelvergiftungs-Erregern und zur Keimzahlbestimmung geeignet (MOSSEL (101)). Als Sporulationsmedien (mit Stärke- und Bikarbonatzusatz) sind die Nährböden nach MOSSEL (101), DUNCAN und STRONG (26), ELLNER (30) und das Sporulationsmedium nach LUND (93) (Trypticase und Casaminosäure) zu erwähnen.

Ein synthetisches Medium beschreiben TSUJI und PERKINS (136) mit Argininzusatz, das die Sporenbildung stark fördert.

2. Mikroskopischer Nachweis

Neben der kulturellen Methode kann man Clostridien auch mikroskopisch nachweisen, doch ist die mikroskopische Methode allein nicht genügend beweiskräftig. Sie soll mehr als Ergänzung der übrigen Nachweismethoden durch Feststellen der Größe und Form der Keime und Sporen und deren Lage im Endosporangium dienen.

Für eine Schnittpräparatmethode anstelle der kulturellen plädiert BREKENFELD (12). Die Clostridien sollen nach der Herstellung des Schnittpräparates mikroskopisch nachgewiesen werden. Doch werden mit dieser Methode die nicht sporulierten Keime vernichtet und damit nicht erfaßt.

3. Serologischer Nachweis

Als dritte Nachweismethode dient die Serologie. Zur schnellen Diagnostik von Cl. perfringens bedienen sich GECK und SZÁNTÒ (41) der Färbung mit Fluoreszein-markierten Antikörpern. Als Farbstoff diente Lissamine Rhodamine RB-200. Eine Färbung ergab sich nur bei Cl. perfringens. Auch Sporen waren spezifisch nachweisbar. Unter Verwendung geeigneter Seren ist es nach Ansicht der Verfasser möglich, zwischen Serotyp A und F zu unterscheiden und zwar in einer Stunde, was nach klassischen Methoden 21 Tage benötigt. In einer anderen Arbeit (42) berichten dieselben von der Schnellmethode (1 Std.) zum Perfringensnachweis aus gemischten Kulturen auf Grund der fluoreszierenden Eigenschaften von Cl. perfringens.

KAUFMAN und WEAVER (67) berichten über eine neue Methode zur Isolierung von Clostridien aus Mischkulturen. Sie basiert auf der Fähigkeit der Clostridien, dem "Difco liver veal agar" zugesetztes Neutralrot (0,004%) zu einer goldgelben fluoreszierenden Substanz zu reduzieren, die nach 18 - 24 Std. im UV-Licht und nach 24 - 48 Std. in gewöhnlichem Licht die Clostridienkolonien umgibt. Andere Anaerobier zeigen diese Reaktion nicht. Die Versuche von KRAUS (82) mit Fluoreszein jedoch schlugen fehl.

Auch Versuche mit dem Neutralisationstest wurden durchgeführt (SERGEVA (123), SHANK (124), WILLIS und HOBBS (141)). Der Botulimus-Neutralisationstest war nach SERGEVA (123) nur in hohen Dosen positiv. Neben der kulturellen Methode führten HOBBS und WILLIS (141) zugleich einen Neutralisationstest für Cl. perfringens Typ A und Cl. oedematiens Typ A durch, indem sie den Agar mit den entsprechenden Antitoxinen bestrichen.

Die Serologie und die Fluoreszenzmethode wären sehr zuverlässige und schnelle Nachweismethoden, doch stehen die dazu erforderlichen Mittel oft nicht zur Verfügung.

4. Tierversuch

Die letzte Nachweismethode ist der Tierversuch. Er dient sowohl zum Nachweis der einzelnen Spezies und deren Serotypen als auch der Prüfung der Pathogenität und Toxizität.

KERRY (74) führte einen Cl.-chauvoei-Serumtest an Mäusen zur Bestätigung seiner kulturell und biochemisch gewonnenen Diagnose durch. Auch ZELLER (148) arbeitete per Tierversuch am Botulismusnachweis (Toxinnachweis). Beim Tierversuch zur Identifizierung von Cl. botulinum Typ E stellte DOLMAN (25) fest, daß das Neurotoxin für Mäuse, Meerschweinchen und Affen, nicht aber für Hühner tödlich war. HALL (zit. aus CANADA und STRONG (18)) unternahm die Typenbestimmung von Clostridien an Hand der Toxinproduktion an serumgeschützten Mäusen, ebenso ANGELOTTI und Mitarbeiter (4). HOWES und Mitarbeiter (61) arbeiteten mit 3 Cl.-histolyticum-Stämmen und fanden bei einem von ihnen ein für Versuchstiere tödliches Neurotoxin.

Zum Nachweis von Cl. botulinum benutzten HADLOK und Mitarbeiter (45) den Mäuseversuch und konnten 1 Tag post injectionem die typischen Krankheitssymptome beobachten.

Auch MOCHMAN (99) verwendet den positiven Tierversuch zur Diagnose von Cl. botulinum.

Die Unterscheidung zwischen Cl. sporogenes und Cl. botulinum ist laut WILLIS (140) auch nur durch den Tierversuch möglich.

Mit Ausnahme von Cl. botulinum, das man allerdings auch biochemisch differenzieren kann, sind Tierversuche zur Diagnose von Clostridienspezies nicht nötig und zu aufwendig.

V. DIFFERENZIERUNG DER CLOSTRIDIUM-SPEZIES

Da nicht alle Clostridienspezies apathogen sind bzw. nicht jede bakteriologische Diagnose "Clostridien" mit der Assoziation von pathogen verbunden sein muß, ist es allein nicht ausschlaggebend, Clostridien nachzuweisen, sondern es erscheint vielmehr notwendig, auch eine nähere Differenzierung durchzuführen.

Ein brauchbares Hilfsmittel zur Differenzierung ist die mikroskopische Untersuchung. Form der Kolonien, Länge und Breite der Stäbchen bzw. deren Auftreibung durch die Sporen, sowie Größe und Anordnung der Sporen kon-

nen wichtige Anhaltspunkte zur Identifizierung liefern (HAUPT (9), BERGEY (11), FORTNER (38), KELCH (72), McLENNAN (97)).

Zur weiteren Bestimmung haben sich biochemische Tests als gut brauchbar erwiesen. Insbesondere prüft man das Spaltungs- bzw. Säuerungsvermögen in der sogenannten "Zuckerreihe" (BERGEY (11), HALLMANN (47), HAUPT (53), KAUFMAN und WEAVER (68)), das Verhalten in Lackmusmilch (BERGEY (11), HAUPT (53), SINELL und LEVETZOW (125)), in Löffler-Serum oder Nagler Reagens (BERGEY (11), HAUPT (53), McLENNAN (97)) und das Bildungsvermögen von Nitrat (HAUPT (53), SINELL und LEVETZOW (125), STRONG und Mitarbeiter (131)), Indol (BERGEY (11), HAUPT (53), KAUFMAN und WEAVER (68), STRONG und Mitarbeiter (131)), Gelatinase (BERGEY (11), KAUFMAN und WEAVER (68), SINELL und LEVETZOW (125), STRONG und Mitarbeiter (131)), Lecithinase (STRONG und Mitarbeiter (131)) und H_2S (HAUPT (53), STRONG und Mitarbeiter (131)). Für die Diagnose von Cl. perfringens ist der Beweglichkeitstest zu erwähnen (MOSSEL (103)).

KAUFMAN und WEAVER (68) testen Gelatinehydrolyse, Indolproduktion und das Spaltungsvermögen bei Glukose, Maltose, Laktose, Saccharose, Mannit und Glycerin. Die Verfasser halten ihre Differenzierungsmethode für ein schnelles Mittel zur Identifizierung besonders von Cl. perfringens und Cl. sporogenes.

Das Verhalten der Clostridien auf Blutplatten (Haemolyse) ziehen z. B. MEYN (98), SINELL und LEVETZOW (125), FORTNER (38), STRONG und Mitarbeiter (131) und McLENNAN (97) zur Differenzierung heran. SINELL und LEVETZOW (125) bedienten sich zur Differenzierung folgender Tests: Kohlehydratvergärung, H_2S-Bildung, Lackmusmilch-Nitratreduktion-Indolbildung im Indol-Nitrit-Medium (BBL), Gelatinase, Beweglichkeit, Haemolyse und mikroskopische Untersuchung.

WILLIS und HOBBS (141) testeten das unterschiedliche Verhalten der Clostridien im Glukose-Gelatine-Medium (Säurebildung und Verflüssigung) und im Laktose-Eigelb-Milch-Agar (Opaleszenz, Proteolyse, Laktosefermentation).

KELCH (72) ging nach folgender Differenzierungsmethode vor: mikroskopische Betrachtung, Leberbrühe (Gas, Schwärzung), Leberagar zur Beobachtung der Kolonien, artspezifische Gerüche (sauer, faulig, Buttersäure),

Gelatinase, Sulfidbildung in Citratagar, H_2S-Bildung, Lackmusmilch, Nitrit, Stärkehydrolyse und Zuckerfermentation.

Eine Unterscheidung der Clostridien anhand ihrer lipolytischen Eigenschaften führten SEBALD und PRÉVOT (122) durch. Doch gibt es hierbei unter den wichtigsten Arten oft keine eindeutig positiven oder negativen Reaktionen, was die Differenzierung ungenau macht.

Zum speziellen Nachweis von Cl. perfringens ist in der Literatur das Medium nach BLADEL und GREENBERG (6) beschrieben.

Eine Erhöhung der Sulfitkonzentration auf 2,0 % läßt nach KUTZNER (84) nur Cl. perfringens in schwarzen Kolonien wachsen.

MOSSEL und Mitarbeiter (103) empfehlen zum Cl.-perfringens-Nachweis den Motilitätstest mit 0,1% KNO_3 und 0,25% Agar in U-Röhrchen.

NYGREN (112) differenziert Cl. perfringens im Eigelbmedium (enthält Phospholipoide). Es zeigt sich bei Anwesenheit von Cl. perfringens eine opaleszierende Zone von Neutralfett um die Kolonien im festen Medium, im flüssigen Nährboden schwimmt das Fett auf der Oberfläche als gelblich-weißer Fleck. Dies kommt dadurch zustande, daß Cl. perfringens das Phosphocholin von den Lezithinmolekülen abspaltet.

C. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. MATERIAL UND METHODIK

1. Entnahme der Proben

Die Entnahme erfolgte bei der bakteriologischen Fleischuntersuchungsstelle des Städtischen Schlachthofs München. Es wurden alle aus Muskelproben isolierten Stämme, die im Rahmen der BU in Leberbrühe unter anaeroben Verhältnissen Gas bildeten und durch einen Ausstrich nach GRAM als anaerobe Gas- oder Sporenbildner erkannt bzw. als "Clostridien in der Muskulatur" identifiziert wurden, zu weiteren Untersuchungen herangezogen.

2. Züchtung

Die Züchtung erfolgte auf Leberbrühe nach KELCH (69) unter Vasparverschluß sowie auf halbfestem Thioglykolatnährboden (Difco) in sterilen Röhrchen mit Zellstoffstopfen. Es wurde jeweils bei 37°C bis zur Gasbildung bzw. Trübung bebrütet.

Um aerobe Gas- oder Sporenbildner (Coliforme, Streptokokken, Bacillus ssp.) auszuschalten, wurde bei allen Proben die Schnell-Katalase durchgeführt. Es wurden wenige ml 3%iger H_2O_2-Lösung auf die beimpfte Nährbodenoberfläche getropft. Ein Aufschäumen (Katalase-positiv) bewies, daß es sich bei der Probe um keine Clostridien bzw. Lactobacillaceae handelte oder daß eine Mischflora von Clostridien (Katalase-negativ) und Katalasepositiven Mikroorganismen vorlag.

3. Zielsetzung

Es sollte eine sichere und nicht zu komplizierte Methode zur Differenzierung der isolierten Clostridien-Stämme erarbeitet sowie der Anteil be-

sonders der fleischhygienisch bedenklichen Keime Cl. botulinum, Cl. perfringens und Cl. sporogenes und die Verteilung auf die Tierarten ermittelt werden.

II. DIFFERENZIERUNG

Da die in der Literatur beschriebenen Differenzierungsverfahren meist sehr umfangreich oder aussageschwach sind, wurde zuerst ein Differenzierungsschlüssel mit aussagekräftigen sowie einfach und schnell durchzuführenden Tests aufgestellt.

Die Identifizierungsmethode wurde für die fleischhygienisch wichtigsten 33 Clostridium-Spezies erarbeitet.

Bei der Ausarbeitung der Differenzierungstabelle wurden die Autoren BERGEY (11), FORTNER (38), HALLMANN (47), HAUPT (53), HUET (62), KATTICH (66), KAUFMAN und WEAVER (68), KELCH (72), KUTZNER (83), LINZENMEIER (92), McLENNAN (97), SINELL und LEVETZOW (125), STRONG und Mitarbeiter (131), WILLIS und HOBBS (141) und WILLIS (140) berücksichtigt.

Folgende Untersuchungsmethoden wurden zur Identifizierung ausgewählt:

1. Morphologie
2. Verhalten in Lackmusmilch
3. Indolbildungsvermögen
4. Glucose-Saccharose- und Lactose-Fermentation ("Zuckerreihe")
5. Gelatinehydrolyse
6. Beweglichkeitsprüfung und
7. Haemolyse

Die Prüfung auf Beweglichkeit wurde nur bei Stämmen durchgeführt, die Gelatinase- und Zucker-positiv waren, da außer Cl. putrefaciens nur das Gelatinase- und Zucker-positive Cl. perfringens unbeweglich ist.

Tabelle 1a

Differenzierungs-Tabelle

Clostridium	Stäbchen			Spore			Lackmus-milch											Glucose					
	lang	schmal	Ketten	rund	terminal	Auftreibung	Reduktion	Säure	Gas	Gerinnung	peptonisiert	stürmisch	unverändert	Beweglichkeit	Indol	Säure	Gas	Saccharose	Lactose	Gelatinase	Haemolyse
butyricum	±	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+			-	+	+	+	+	-	-
belfantii	-	+	+	-	-	+			+	+	+	+			+	+		+	+	-	-
beijerinckii	+		+	-	-	+	+	+	+	+	-	+			-	+		+	+	-	-
multifermentans		-	+	-	-	+		+	+	+	-	+			-	+		+	+	-	
acetobutylicum	-	+	-	-	-	+		+	+	+	+	+			-	+		+	+	-	-
pasteurianum	-	-		-	-	+							+		-	+		+	-	-	-
tyrobutyricum	+	-		-	-	+							+		-	+		-	-	-	
difficile	+	-		-	-	+							+		-	+		-	-	-	-
nigrificans	-	+		-	-	+							+		-	-		-	-	-	-
septicum	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+			-	+	+	-	+	+	+
chauvoei	±	-	+	-	-	+		+	+	+	-				-	+	+	+	+	+	+
novyi	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+				-	+	+	-	-	+	+
perfringens	±	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+		-	-	+	+	+	+	+	+
bifermentans	-	-	+	-	-	±				+	+				+	+		-	-	+	+
sordelli	-	-	+	-	-	±				+	+				+	+		-	-	+	+
botulinum	±	±	+	-	-	+	+	+	-	+	+				-	+	+	-	-	+	+
parabotulinum	±	±	+	-	-	+		+		+	+				-	+		-	-	+	+
sporogenes	±	±	+	-	-	+	+	+	+	+	+				-	+	+	-	-	+	+
aerofoetidum	-	+	+	-	-	+		+	+	+	+					+		-	+	+	-
haemolyticum	-	-	+	-	-	+		+		+	-	+			+	+		-	-	+	+
carnis	-	+	+	-	-	+							+		-	+		+	+	-	+
histolyticum	-	+	-	-	+	+	+		+	+	+				-	-	-	-	-	+	+
tertium	-	+	-	-	+	+		+	+	+	-				-	+		+	+	-	+
paraputrificum	-	+	+	-	+	+			+	+	-	+			-	+		+	+	-	-
cochlearium	-	±	+	-	+	+						+				-		-	-	-	
capitovale	-	+	+	-	+	+		+		±	-		(+)		±	+		-	-	+	-
sphenoides	-	±	+	+	-	+		+		+	-				-	+		±	+	-	+
tetanoides	+	+	+	+	+	+							+		+	+		-	-	-	±
tetani	+	+	+	+	+	+							+		±	-		-	-	+	+
tetanomorphum	±	-	-	+	+	+							+		±	+		-	-	-	-
lentoputrescens	+	+	+	+	+	+				+	+				±	-		-	-	+	+
putrefaciens	+	+	+	+	+	+								-		-		-	-	-	
thermosaccharo-lyticum	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-				-	+		+	+	-	

Nach dem vorliegenden Differenzierungsschlüssel kann man einige Spezies noch nicht sicher typisieren sondern nur in Gruppen zusammenfassen. Das wären die Gruppe Cl. butyricum, Cl. beijerinckii, Cl. multifermantans, die Cl. botulinum (Cl. parabotulinum) - Cl. sporogenes-Gruppe, die Cl. difficile - Cl. tyrobutyricum-Gruppe und die Cl. bifermentans - Cl. sordelli-Gruppe.

Die endgültige Differenzierung dieser Gruppen erfolgte nach BERGEY (10), HUET (62) und WILLIS (140).

Tabelle 1b

Cl.	Glycerin	Mannit	Urease	Salicin	Stärke
butyricum	-	+			+
beijerinckii	-	+			-
multifermentans	+	-			
botulinum	+				
(parabotulinum)	+				
sporogenes	-				
difficile				+	
tyrobutyricum				-	
bifermentans		+	-	+	
sordelli		-	+	-	

III. VERSUCHSBESCHREIBUNGEN

1. Mikroskopische Untersuchung

Es wurden mikroskopische Ausstrichpräparate mit der Sporenfärbung nach RAKETTE angefertigt. Teilweise bewährte sich auch die einfachere und schnellere Färbung mit Methylviolett. Länge, Breite und eventuelle Kettenbildung der vegetativen Zelle sowie Größe, Form, Lage der Spore und die Auftreibung der Zelle durch die Spore wurden zur Beurteilung herangezogen. Konnte eine Auftreibung des Endosporangiums durch die Spore nicht mit Sicherheit ausgemacht werden (wichtig bei Cl. perfringens und Cl. bifermentans), so wurden auf einem Ausstrichpräparat eine alte und eine junge Kultur des Stammes nebeneinander aufgetragen und verglichen.

Um eine gleichbleibende und vergleichbare Morphologie der einzelnen Stämme zu gewährleisten, wurde das Ausstrichmaterial immer nur aus Kulturen in Thioglykolatmedium in 4tägigen Abständen entnommen.

2. Prüfung des Verhaltens in Lackmusmilch

Frische Magermilch wurde mit 7% Lackmustinktur versetzt und im Wasserbad erhitzt. Nach dem Abfüllen zu je 10 ml in sterile Röhrchen wurde der Nährboden an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 Stunde tyndallisiert und nach dieser Prozedur 2 - 3 Tage bei 37°C bebrütet (Sterilitätskontrolle). Dann erst beimpfte man die Röhrchen und verschloß sie zusätzlich mit Vaspar. Sie wurden im Brutschrank bei 37°C mindestens 10 Tage beobachtet.

Folgende Kriterien wurden hierbei beachtet:

Reduktion des Lackmusfarbstoffes,
Säuerung bzw. Alkalibildung,
Gasbildung (Hochdrücken des Vasparverschlusses),
Gerinnung und
Peptonisierung (teilweise oder totale Verdauung der geronnenen Milch).

Typisch war das Verhalten von frisch isolierten Cl.-perfringens-Stämmen, die oft schon nach 2 - 8 Stunden eine stürmische Gasbildung, Reduktion,

Gerinnung und Zerreißung des Gerinnsels zeigten.

3. Indolbildungsvermögen

Zum Nachweis der Indolbildung versetzte man MERCK-Standard-II-Bouillon (15 g auf 1 l aqua dest.) mit 1% Trypton. Nach Lösen im Wasserbad und Abfüllen zu 10 ml in sterile Röhrchen mit Zellstoffstopfen wurden die Röhrchen mit Nährgut bei 121°C und 1,1 atü 15 min. im Autoklaven sterilisiert, in kaltem Wasser rasch abgekühlt (Vermeidung von Konvektionsströmung) und mit sterilen Pipetten beimpft. Nach dem Bebrüten wurde die Reaktion durch Hinzufügen von 0,5 ml KOVÁCS-Reagenz abgelesen. Als positiv galt das Auftreten eines (kirsch-)roten Ringes.

4. Die "Zuckerreihe"

Allgemein wurden Glucose, Saccharose und Lactose verwendet, zur Unterscheidung der Cl. butyricum - Cl. beijerinckii - Cl. multifermentans-Gruppe (siehe Seite 26) zusätzlich Mannit, für die Cl. botulinum - Cl. sporogenes-Gruppe Glycerin und zur Unterscheidung von Cl. difficile und Cl. tyrobutyricum Salicin.

Glucose

Es wurde Gasbildung und Säuerung in 0,5%iger Glucose-Nährbouillon geprüft.

In normale Reagenzröhrchen gab man kleine DURHAM-Röhrchen mit der Öffnung nach unten und sterilisierte sie im Autoklaven 20 min. Zur Bereitung des Glucose-Nährmediums verwandte man MERCK-Standard-I-Bouillon, die mit 10%iger Glucoselösung (steril) versetzt und dadurch auf einen Gehalt von 0,5% Glucose gebracht wurde. Nach Abfüllen von je 10 ml in vorbereitete Röhrchen wurde im Autoklaven 15 min. sterilisiert und nach dem Abkühlen in kaltem Wasser beimpft. Nach dem Bebrüten konnte man die Gasbildung im DURHAM-Röhrchen beobachten und die Säurebildung durch Zusatz von 3 Tropfen Bromkresolpurpur-Bromkresolgrün-Indikator prüfen. Ein Farbumschlag von Blau mit Rotstich (Leerprobe) auf blau-grün galt schon als po-

sitive Reaktion. Dabei hielt man an einer pH-Schätzung von indigo = 6,0, grün = 5,0, gelbgrün = 4,0 und hellgelb = 3,5 fest.

Saccharosevergärung

MERCK-Standard-II-Bouillon wurde durch Zusatz einer Saccharoselösung auf einen Gehalt von 0,5% Saccharose gebracht, in sterile Röhrchen mit Zellstoffverschluß abgefüllt und autoklaviert. Nach dem Beimpfen und Bebrüten wurde der Grad der Säuerung durch Zusatz einiger Tropfen Indikator (s.o.) festgestellt.

Ähnlich wurden die Ansätze mit
Lactose
Mannit
Salicin und
Glycerin durchgeführt.

5. Gelatinehydrolyse

Es wurde die Fähigkeit der Clostridien, Gelatine mittels des Ferments Gelatinase zu verflüssigen, geprüft. Hierzu löste man 18% Gelatine (Gelatina alba DAB 7, silberweiß) in MERCK-Standard-II-Bouillon im Dampftopf, füllte sie in sterile Röhrchen ab und tyndallisierte an 3 aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 Std. Die Beimpfung erfolgte in den noch leicht warmen Nährboden. Nach 4tägiger Bebrütung bei 37°C wurden die Röhrchen für 2 Std. in den Kühlschrank gestellt. Als Gelatinase-positiv galten diejenigen Proben, bei denen trotz zweistündiger Abkühlung die Gelatinebouillon noch flüssig war.

6. Beweglichkeitsprüfung

Die Prüfung auf Beweglichkeit wurde nur bei Cl. perfringens- und Cl. putrefaciens-verdächtigen Stämmen vorgenommen, da nur diese unbeweglich sind.

Man weichte 0,85% Agar in MERCK-Standard-II-Bouillon ein, löste im Dampftopf, filtrierte anschließend und füllte das Nährsubstrat zu 10 ml

in sterile Röhrchen ab. Nach dem Autoklavieren wurde im Stich beimpft.

Nach dem Beimpfen wurde je nach Wachstum 2 - 7 Tage bei 37°C bebrütet. Als positiv galt ein deutliches Auswandern von Kolonien rund um den Stichkanal, als negativ ein Wachstum nur im Stichkanal ohne Auswandern zur Seite ("Wurzelbildung").

7. Haemolyse

Die Beobachtung der haemolysierenden Eigenschaften der Clostridien ist nach dem ausgearbeiteten Differenzierungsschema nicht unbedingt erforderlich. Sie wurde nur zur Ergänzung durchgeführt.

Hierzu wurden Blutplatten verwendet, die von der bakteriologischen Fleischuntersuchungsstelle München freundlicherweise zur Verfügung gestellt wurden.

Auf eine Blutplatte (10 - 12% Schweineblut) wurde mit einer abgeflammten Impföse das Impfmaterial von 8 Stämmen radiär jeweils als 1 - 2 cm langer Strich aufgetragen und im Brutschrank bei 37°C 1 - 2 Tage bebrütet. Es wurde nur auf eine grünliche Verfärbung oder auf eine Aufhellung um die Kolonien geachtet.

8. Urease-Test

Die Prüfung auf Urease wurde nur zur Unterscheidung von Cl. bifermentans und Cl. sordelli durchgeführt. Man löste Urea-Agar-Base (DIFCO) nach CHRISTENSEN in 29%igem Anteil in aqua dest. und filtrierte es steril durch einen SEITZ-Filter.
In einem 2. Arbeitsgang wurde Bacto-Agar (1,7%) in Wasser gelöst und anschließend autoklaviert. Nach Abkühlen auf ca. 50 - 55°C gab man die filtrierte Urea-Base in 9%igem Anteil zum Agar hinzu, durchmischte das Medium, füllte in sterile Röhrchen ab und beimpfte. Die Röhrchen wurden 7 Tage bei 37°C bebrütet. Als positive Reaktion (= Cl. sordelli) galt ein Farbumschlag nach rot.

Differenzierung zwischen Cl. bifermentans und Cl. sordelli kann nach WILLIS (140) auch mit Mannit, Sorbit oder Salicin durchgeführt werden

9. Stärke-Test

Der Starke-Test zur Unterscheidung zwischen dem positiven Cl. butyricum und dem stärkenegativen Cl. beijerinckii geschah technisch auf demselben Weg wie bei der Saccharose- oder Lactose-Fermantation, nur wurde zu MERCK-Standard-II-Bouillon 1% lösliche Stärke zugegeben.

IV. ERGEBNISSE

Die Versuche wurden an insgesamt 158 Proben durchgeführt und nach der Differenzierungstabelle ausgewertet.

Von den 158 Proben stammten 67 (42,2%) von Rind, Jungrind und Bulle, 46 (29,1%) vom Kalb, 40 (25,3%) vom Schwein, 4 (2,5%) vom Schaf und eine (0,9%) vom Pferd.

1. Ergebnistabellen

Tabelle 2

Morphologie und biochemisches Verhalten der identifizierten Spezies

	Stäbchen			Spore			Lackmus-milch :									Glucose											
Typ No.	lang	schmal	Ketten	rund	terminal	Auftreibung	Reduktion	Säure	Gas	Gerinnung	peptonisiert	stürmisch	unverändert	Beweglichkeit	Indol	Säure	Gas	Saccharose	Lactose	Gelatinase	Haemolyse	Glycerin	Mannit	Urease	Salicin	Stärke	Clostridium
1	±	±	+	-	-	+	+	+	+	+		(+)			-	+	+	+	+	+	+						chauvoei
2	±	+	+	-	-	+	+	+	+	+		+			-	+	+	-	+	+	+						septicum
3	±	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+				-	+	+	-	-	+	+						novyi
4 a	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+		+		-	-	+	+	+	+	+	+						perfringens
4 b	±	-	+	-	-	-	+		+	+		+		-	-	+	+	+	+	+	+						perfringens
5 a	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+				-	+	+	-	-	+	+	-					sporogenes
5 b	+	+	+	-	-	+	+		+	+	+				-	+	+	-	-	+	+	-					sporogenes
6 a	-	-	+	-	-	±	+	+	+	+	+				+	+	+	-	-	+	+			-			bifermentans
6 b	-	±	+	-	-	±	+		+	+	+				+	+	+	-	-	+	+			-			bifermentans
7	+	±	-	-	+	+	+	+	+	+					-	+	+	+	+	-	+		+			+	tertium
8	±	+	+	-	-	+							+		-	+	+	+	+	-	+						carnis
9 a	+	±	+	-	+	+	+	+	+	+					-	+	+	+	+	-	-		-				paraputrificum
9 b	+	±	+	-	+	+	+		+						-	+	+	+	+	-	-		-				paraputrificum
10	±	±	-	-	-	+							+		-	+	+	-	-	-	-				+		difficile
11	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+					-	+	+	+	+	-	-		-				multifermentans
12	+	±	+	+	+	+	+		+	+	+				-	-	-	-	-	+	+						lentoputrescens
13a	+	±	+	-	-	+	+		+	+		+			-	+	+	+	+	-	-		+			+	butyricum
13b	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+		+			-	+	+	+	+	-	-		+			+	butyricum
14a	±	±	+	-	-	+	+	+	+	+		+			-	+	+	+	+	-	-		+			-	beijerinckii
14b	±	-	+	-	-	+	+	+	+	+		+			-	+	-	+	+	-	-		+			-	beijerinckii
15	±	±	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+	+	-	-						belfantii
16	+	-	+	-	-	+							+		-	+	+	-	-	-	-				-		tyrobutyricum
17	-	-	-	-	-	+							+		-	+	+	+	-	-	-						pasteurianum
18	±	±	+	+	+	+							+		+	+	+	-	-	-	+		-			-	tetanoides

Tabelle 3

Liste der differenzierten Stämme

Clostridium	Anzahl	Nummern der Stämme
chauvoei	7	10, 17, 20, 52, 71, 100, 110.
septicum	3	42, 105, 119.
novyi	4	21, 49, 57, 58.
perfringens	26	Typ a : 12, 13, 15, 25, 34, 37, 44, 51, 54, 61, 75, 78, 84, 85, 87, 88, 90, 101, 102, 116, 138, 143, 144, 146, 158, Typ b : 69.
sporogenes	17	Typ a : 14, 64, 68, 106, 108, 118, 120, 122, 123, 124, 132, 136, 137, 154, Typ b : 77, 133, 146.
bifermentans	8	Typ a : 2, 135, Typ b : 33, 76, 93, 107, 112, 135.
tertium	13	1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 31, 66, 73, 104, 111.
carnis	12	19, 26, 29, 39, 43, 72, 81, 86, 126, 145, 147, 157.
paraputrificum	8	Typ a : 38, 47, 60, 99, 114, 115, Typ b : 70, 121.
difficile	7	22, 41, 59, 91, 131, 150, 153.
multifermentans	2	129, 142.
lentoputrescens	2	62, 83.
butyricum	28	Typ a : 16, 27, 36, 45, 46, 50, 56, 92,130, 139, Typ b : 18, 24, 28, 32, 35, 40, 65, 74, 79, 94, 109, 113, 117, 128, 134, 149, 152.
beijerinckii	9	Typ a : 127, 140, Typ b : 4, 23, 30, 53, 98, 103, 151.
belfantii	7	63, 67, 89, 96, 97, 141, 156.
tyrobutyricum	3	48, 55, 80.
pasteurianum	1	82.
tetanoides	1	155.

Tabelle 4

I

Differenzierte Kontrollstämme

Stamm	Stäbchen			Spore			Lackmus-milch :									Glucose											
No.	lang	schmal	Ketten	rund	terminal	Auftreibung	Reduktion	Säure	Gas	Gerinnung	peptonisiert	stürmisch	unverändert	Beweglichkeit	Indol	Säure	Gas	Saccharose	Lactose	Gelatinase	Haemolyse	Glycerin	Mannit	Urease	Salicin	Stärke	Clostridium
161	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-				-	+		+	+	-	-		-				paraputrificum
162	+	-	+	-	-	±	+		+	+	+				+	+	+	-	-	+	+			-			bifermentans
163	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+			-	+	+	+	+	-	-		+			+	butyricum
164	+	+	+	-	-	+		+	+	+	+				-	+	+	-	-	+	+	-					sporogenes
165	±	±	+	+	+	+	+		+	+	+				-	-	-	-	-	+	+						lentoputrescens
166	±	±	+	-	-	+			+	+	+				-	+	+	-	-	+	+	-					sporogenes
167	±	-	+	-	-	-	+	+	+	+				-	-	+	+	+	+	+	+						perfringens
168	-	±	+	-	-	+	+	+		+	+	+			+	+	+	+	+	-	-						belfantii
169	±	-	+	-	-	-	+	+	+	+		+		-	-	+	+	+	+	+	+						perfringens

Tabelle 4 (Fortsetzung)

II

Herkunft der Kontrollstämme

No.	Herkunft	Clostridium
161	Fischkonserve	paraputrificum
162	ATCC 2 9714	bifermentans
163	ATCC 3 6014	butyricum
164	ATCC 4 3538	sporogenes
165	ATCC 5 6391	lentoputrescens
166	ATCC 6 7955	sporogenes
167	Schmelzkäse	perfringens
168	Ravioli-Bombage	belfantii
169	Dosenwürstchen	perfringens

2. Identifizierte Clostridienarten

Es wurden 18 verschiedene Clostridiumspezies identifiziert. Von 158 Stämmen waren:

28 (17,7%) Cl. butyricum
26 (16,5%) Cl. perfringens
17 (10,8%) Cl. sporogenes
13 (8,2%) Cl. tertium
12 (7,6%) Cl. carnis
9 (5,7%) Cl. beijerinckii
8 (5,1%) Cl. bifermentans
8 (5,1%) Cl. paraputrificum
7 (4,4%) Cl. chauvoei
7 (4,4%) Cl. difficile
7 (4,4%) Cl. belfantii
4 (2,5%) Cl. novyi
3 (1,9%) Cl. septicum
3 (1,9%) Cl. tyrobutyricum
2 (1,3%) Cl. multifermentans
2 (1,3%) Cl. lentoputrescens
1 (0,6%) Cl. pasteurianum
1 (0,6%) Cl. tetanoides

Cl. botulinum wurde nicht isoliert.

Ergebnis der Kontrollstämme

Die anonymen Kontrollstämme wurden nach dem Differenzierungsschema eindeutig identifiziert.

Von den 9 Kontrollstämmen wurden je 2 als Cl. perfringens und Cl. sporogenes und je ein Stamm als Cl. bifermentans, Cl. paraputrificum, Cl. butyricum und Cl. belfantii diagnostiziert.

3. Verteilung der Clostridiumspezies auf die Tierarten

Rind

Von den 67 Clostridienstämmen, isoliert aus Rindermuskulatur, waren: 10 (15,0%) Cl. perfringens, je 9 (13,4%) Cl. sporogenes und Cl. butyricum, je 6 (9,0%) Cl. chauvoei und Cl. beijerinckii, je 5 (7,4%) Cl. bifermentans, Cl. paraputrificum und Cl. belfantii, je 4 (6,0%) Cl. novyi und Cl. tertium, 2 (3,0%) Cl. septicum und je 1 (1,5%) Cl. multifermentans und Cl. tetanoides.

Kalb

In 46 Kälbermuskeln fand man je 11 (23,9%) Cl. perfringens und Cl. butyricum, je 5 (10,9%) Cl. tertium und Cl. difficile, 3 (6,5%) Cl. tyrobutyricum, je 2 (4,3%) Cl. sporogenes und Cl. carnis und je 1 (2,2%) Cl. chauvoei, Cl. bifermentans, Cl. multifermentans, Cl. lentoputrescens, Cl. beijerinckii und Cl. pasteurianum.

Schwein

Aus 40 Schweinemuskel-Proben wurden 10 (25,0%) Cl. carnis, je 6 (15,0%) Cl. sporogenes und Cl. butyricum, je 3 (7,7%) Cl. perfringens, Cl. tertium und Cl. paraputrificum, je 2 (5,0%) Cl. bifermentans, Cl. difficile und Cl. beijerinckii und je 1 (2,5%) Cl. septicum, Cl. lentoputrescens und Cl. pasteurianum isoliert.

Schaf

Von den 4 Clostridiumstämmen beim Schaf wurden 2 als Cl. perfringens und je 1 als Cl. tertium und Cl. butyricum identifiziert.

Pferd

Aus einer Muskelprobe isolierte man Cl. butyricum.

Übersicht über die Verteilung der Clostridiumspezies auf die Tierarten

Clostridium			chauvoei		septicum		novyi		perfringens		sporogenes		bifermentans		tertium		carnis		paraputrificum	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Rind	67	42,2	6	9,9	2	3,0	4	6,0	10	15,0	9	13,4	5	7,4	4	6,0			5	7,4
Kalb	46	29,1	1	2,2					11	23,9	2	4,3	1	2,2	5	10,9	2	4,3		
Schwein	40	25,3			1	2,5			3	7,5	6	15,0	2	5,0	3	7,5	10	25,0	3	7,5
Schaf	4	2,5							2						1					
Pferd																				
	158	100	7	4,4	3	1,9	4	2,5	26	16,5	17	10,8	8	5,1	13	8,2	12	7,6	8	5,1

Clostridium			difficile		multifermentans		lentoputrescens		butyricum		beijerinckii		belfantii		tyrobutyricum		pasteurianum		tetanoides	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
Rind	67	42,2			1	1,5			9	13,4	6	9,0	5	7,4					1	1,5
Kalb	46	29,1	5	10,9	1	2,2	1	2,2	11	23,9	1	2,1	2	4,3	3	6,5				
Schwein	40	25,3	2	5,0			1	2,5	6	15,0	2	5,0					1	2,5		
Schaf	4	2,5							1											
Pferd	1	0,9							1											
	158	100	7	4,4	2	1,3	2	1,3	28	17,7	9	5,7	7	4,4	3	1,9	1	0,6	1	0,6

4. Vergleichende Gegenüberstellung der Tierarten bezüglich der Verteilung der Clostridienspezies

. perfringens: Von den 26 Stämmen des Erregers des Gasgangräns, der Enterotoxämie und von Lebensmittelintoxikationen traten 11 beim Kalb auf, weitere 10 beim Rind, während diese Clostridienart mit nur 3 Stämmen beim Schwein vertreten war. Beim Schaf trat der Stamm zweimal auf.

Cl. sporogenes war bei Rind (13%) und Schwein (15%) etwa gleich stark vertreten, während dieser Keim beim Kalb nur einen geringen Anteil (4,3%) einnahm.

Cl. chauvoei: Die 7 isolierten Stämme des Rauschbranderregers traten alle beim Rind (einschließlich eines Stammes beim Kalb) auf.

Cl. septicum: 2 von 3 Stämmen des Para-Geburtsrauschbrand-Erregers fand man beim Rind, einen beim Schwein.

Cl. novyi: Die 4 Stämme des Erregers des malignen Oedems und der "black disease" beschränkten sich in ihrem Auftreten auf das Rind.

Cl. carnis: Hier war eine evidente Häufung beim Schwein festzustellen (10 der 12 isolierten Kulturen), während diese Spezies beim Rind nicht vorkam.

Cl. paraputrificum trat nicht beim Kalb auf.

Cl. difficile fand sich vermehrt beim Kalb. 5 von 7 isolierten Kulturen entfielen auf diese Tierart.

Cl. butyricum: Wie Cl. perfringens findet sich dieser Keim gehäuft beim Kalb (11 von insgesamt 28 Cl. butyricum-Stämmen).

Cl. beijerinckii isolierte man in 6 von 9 Fällen beim Rind.

Cl. belfantii: Die 7 Stämme waren auf das Rind (einschließlich Kalb) beschränkt.

Cl. tyrobutyricum: Diese Spezies fand sich nur bei Kälbern (3mal).

Bei den übrigen Clostridium-Spezies konnte wegen der geringen Anzahl der identifizierten Stämme und/oder der ziemlich gleichmäßigen Verteilung auf die Tierarten keine Gegenüberstellung erfolgen.

5. Vergleichende Betrachtung über den Zusammenhang zwischen Auftreten von Clostridien und dem Vorbericht bzw. pathologisch-anatomischen Befund

Ein offensichtlicher Zusammenhang kann angenommen werden beim Vorbericht "Metritis, Uterusruptur und Scheidenriß post partum" (je einmal) und dem Auftreten des Rauschbranderregers Cl. chauvoei (feseri) beim Rind, ebenso beim Zusammenhang von Geburtsschäden und äußerer Verletzung beim Rind (je einmal) mit dem bakteriologischen Befund "Cl. septicum" (Pararausch-Geburtsrauschbrand). Ähnlich liegt der Fall beim Auftreten von Cl. novyi ("oedematiens") bei Uterusruptur und Fraktur (je einmal) des Rindes. Auch ein Zusammenhang zwischen Cl. perfringens und Fraktur, Darm- und Uterusruptur und "Gaskalb" beim Rind kann angenommen werden. Bei einem Gasbrand- bzw. Gasoedemverdacht beim Rind wurde der Erreger als Cl. butyricum identifiziert. Auffallend war noch, daß bei 2 aufgetretenen Mastitiden beim Rind in beiden Fällen Cl. belfantii isoliert wurde.

Beim Kalb scheint ein Zusammenhang zwischen dem Befund "Pleuro-Pneumonie" und "Cl. perfringens" zu bestehen (10 mal).
Auch ein gehäuftes Auftreten von Cl. tertium und Cl. difficile fand sich im Zusammenhang mit Pleuropneumonien beim Kalb.

Von den 4 Proben vom Schaf waren 2 Cl. perfringens, die jeweils im Zusammenhang mit der Diagnose "Pleuropneumonie" auftraten.

Der Erreger eines "jauchigen Fleisches" beim Schwein war Cl. carnis. Sonst ist die Verteilung von Cl. carnis beim Schwein ohne Besonderheiten, sieht man vom Auftreten von Cl. carnis bei 2 Frakturen ab.

Cl. perfringens, Cl. sporogenes, Cl. bifermentans, Cl. tertium, Cl. paraputrificum, Cl. difficile, Cl. butyricum, Cl. beijerinckii, Cl. belfantii und Cl. tyrobutyricum wurden in der Muskulatur von Tieren gefunden, bei denen Darmrupturen und Enteritiden festgestellt wurden.

Tabelle 6

Verteilung der Clostridiumspezies bei den Tierarten unter Berücksichtigung des Vorberichtes bzw. des pathologisch-anatomischen Befundes

Verhältnisse beim Rind

Vorbericht bzw. pathol.-anatom. Befund / Clostridium	chauvoei	septicum	novyi	perfringens	sporogenes	bifermentans	tertium	carnis	paraputrificum	difficile	multifermentans	lentoputrescens	butyricum	beijerinckii	belfantii	tyrobutyricum	pasteurianum	tetanoides
Pneumonie						2							1					
Pleuritis																		
Epi-Pericarditis	1																	
Peritonitis	1		3	1	1	1	3		1					1				
Gastritis																		
Tympanie				2		1			1									
Enteritis					3										1			
Darmruptur				1														
Darmverwachsungen					1	1												
Hepatitis				1	2				1				2					
Omphalophlebitis																		
Milzschwellung																		
Nierenerkrankungen	1		2				1											
Metritis, Pyometra	1								1									
Uterusruptur	1		1	2														
Geburtsverletzungen	1	1											1					
Retentio secundin.													1					
Abort					1													
tote Früchte															1			
"Gaskalb"				1														
Gebärparese					1				2				2	3				
Mastitis															2			
Rotlaufkomplex																		
Arthritis				1	1													1
Abszesse													1					
äußere Verletzungen		1																
Fraktur			1	1			1											
Gasbrandverdacht													1					
jauchiges Fleisch																		
schlechte Ausblutung																		
Abmagerung																		
Notschlachtung						1									1			
Impfschaden	1																	

Tabelle 7

Verteilung der Clostridiumspezies bei den Tierarten unter Berücksichtigung des Vorberichtes bzw. des pathologisch-anatomischen Befundes

Verhältnisse beim Kalb

Vorbericht bzw. pathol.-anatom. Befund \ Clostridium	chauvoei	septicum	novyi	perfringens	sporogenes	bifermentans	tertium	carnis	paraputrificum	difficile	multifermentans	lentoputrescens	butyricum	beijerinckii	belfantii	tyrobutyricum	pasteurianum	tetanoides
Pneumonie	1			9			4	1		3			3					
Pleuritis				1						1						1		
Epi-Pericarditis																		
Peritonitis																		
Gastritis					1													
Tympanie						1	1						1		1			
Enteritis							1						1			2		
Darmruptur																		
Darmverwachsungen																		
Hepatitis																		
Omphalophlebitis									1		1			1				
Milzschwellung													1					
Nierenerkrankungen	1			2								1	4		1			
Metritis, Pyometra																		
Uterusruptur																		
Geburtsverletzungen																		
Retentio secundin.																		
Abort																		
tote Früchte																		
"Gaskalb"																		
Gebärparese																		
Mastitis																		
Rotlaufkomplex																		
Arthritis										1			1					
Abszesse					1													
äußere Verletzungen																		
Fraktur																		
Gasbrandverdacht																		
jauchiges Fleisch																		
schlechte Ausblutung								1					1					
Abmagerung																		
Notschlachtung																		
Impfschaden																		

Tabelle 8

Verteilung der Clostridiumspezies bei den Tierarten unter Berücksichtigung des Vorberichtes bzw. des pathologisch-anatomischen Befundes

Verhältnisse beim Schwein

Vorbericht bzw. pathol.-anatom.Befund / Clostridium	chauvoei	septicum	novyi	perfringens	sporogenes	bifermentans	tertium	carnis	paraputrificum	difficile	multifermentans	lentoputrescens	butyricum	beijerinckii	belfantii	tyrobutyricum	pasteurianum	tetanoides
Pneumonie					1	1	1	3	1	1			2					
Pleuritis							1						1				1	
Epi-Pericarditis						1		1					1				1	
Peritonitis																		
Gastritis																		
Tympanie																		
Enteritis				1		1			1	1			2	1				
Darmruptur																		
Darmverwachsungen							1											
Hepatitis					1													
Omphalophlebitis																		
Milzschwellung																		
Nierenerkrankungen					1			1										
Metritis, Pyometra																		
Uterusruptur																		
Geburtsverletzung								1										
Retentio secundin.																		
Abort																		
tote Früchte							1											
"Gaskalb"																		
Gebärparese																		
Mastitis																		
Rotlaufkomplex		1			1			2	1									
Arthritis				1	2					1		1	1	1				
Abszesse								1								1		
äußere Verletzungen																		
Fraktur						1		2										
Gasbrandverdacht																		
jauchiges Fleisch								1										
schlechte Ausblutung																		
Abmagerung				1														
Notschlachtung													1					
Impfschaden																		

D. DISKUSSION UND BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

I. DIFFERENZIERUNGSMETHODE

Die an Hand des erstellten Differenzierungsschlüssels durchgeführte Methode der Identifizierung war sicher, was die eindeutige Differenzierung der 9 (anonymen) Kontrollstämme (davon 6 ATCC-Stämme) bewies. Nur die Unterscheidung zwischen Cl. sporogenes und Cl. botulinum - im Hinblick auf die Gefährlichkeit von Cl. botulinum wichtig - bereitete anfängliche Schwierigkeiten, da einige Autoren (WILLIS (140), LERCHE (88), ZELLER (148), FRAZIER (40), MOCHMAN (99), HAUPT (53), HADLOK (45)) die endgültige Identifizierung von Botulinus-Keimen nur durch den Pathogenitäts-Test (Tierversuch) gewährleistet sehen.

BERGEY (11) und KAUFMAN und WEAVER (67) jedoch geben als Unterschied zwischen den beiden Stämmen das unterschiedliche Fermentationsvermögen von Glycerin an. Nach dieser Methode wurde vorgegangen.

Wie der Pathogenitätstest scheitert auch der sehr sichere serologische Nachweis von Botulismus meist an finanziellen und räumlichen Mängeln.

Längere Zeit benötigt die mikroskopische Untersuchung, da einige Stämme (z. B. Cl. perfringens) sehr langsam versporen, die Form und Lage der Sporen ist aber zur Differenzierung unerläßlich.

Die bei manchen Autoren zur Identifizierung mit herangezogene Beurteilung der Kolonienform wurde unterlassen, da dafür in Anaerobengefäßen gezüchtet werden müßte; die Beurteilung der Kolonienform schließt außerdem ein subjektives Moment nicht aus.

II. DIFFERENZIERTE STÄMME

Unter den 18 differenzierten Clostridienarten machen die 3 am häufigsten isolierten Stämme, nämlich Cl. butyricum, Cl. perfringens und Cl. sporogenes mit 45% fast die Hälfte aller diagnostizierten Stämme aus.

Die Häufigkeit von Cl. carnis (13) ist bemerkenswert, da diese Art nach WILLIS (140) als selten gilt.

Cl. perfringens, als Erreger von milden Lebensmittelvergiftungen zumeist in Form von Massenausbrüchen von Bedeutung, war in einem Anteil von 16,5% an der Gesamtheit von 158 Clostridien-haltigen Proben vertreten.

Cl. sporogenes, ebenfalls als Erreger von Lebensmittelintoxikationen beschrieben, fand man in 10,8% der Fälle. Insgesamt waren demnach 27,3% der Proben für menschlichen Genuß bedenklich.

III. DIE VERTEILUNG DER ANAEROBEN AUF DIE TIERARTEN

Rind

Von 67 Rinderproben entfielen 6 auf den Rauschbranderreger Cl. chauvoei ("feseri"), je 2 auf den Para-Geburtsrauschbrand-Erreger Cl. septicum und 4 auf den Erreger der "black disease" und Haemoglobinurie Cl. novyi ("oedematiens"). Diese 3 Stämme, die beim Rind zu schweren Erkrankungen führen können, machen 18% des Gesamtmaterials vom Rind aus. Von den Lebensmittelvergiftungs-Erregern entfielen 15% auf Cl. perfringens und 13,4% auf Cl. sporogenes. Sie nehmen einen Anteil von insgesamt 28,4% beim Rind ein.

Kalb

Beim Kalb war der Cl. perfringens- und Cl. butyricum-Anteil wesentlich höher als bei den übrigen Tieren. Etwa denselben Anteil wie beim Rind, nämlich 28,2% von der Gesamtzahl der Kälberproben, nahmen die fleischhygienisch bedeutenden Keime Cl. perfringens (23,9%) und Cl. sporogenes (4,3%) ein.

Cl. tertium, das beim Kalb öfter vorkam als bei anderen Tieren, wird nach WILLIS (140) nicht allzu selten in kontaminierten Nahrungsmitteln gefunden.

Schwein

Beim Schwein fiel der sehr geringe Anteil von Cl. perfringens (7,7%) auf. Cl. perfringens (7,5%) und Cl. sporogenes (15,0%) machten 22,5% der

Proben vom Schwein aus. Danach hat das Schwein einen etwa um 6% niedrigeren Anteil an möglichen Fleischvergiftungserregern als Rind und Kalb. Einen großen Anteil, nämlich 25% (10 von 40), nimmt Cl. carnis ein. Der Keim, zum erstenmal von KLEIN (ref. aus WILLIS (140)) aus faulem Fleisch isoliert und von BERGEY (11) als auch im Rindfleisch vorkommend beschrieben, gilt als seltener Stamm. Er wurde von HIBLER (ref. aus WILLIS (140)) aus Gartenerde isoliert. Der Schluß liegt nahe, daß diese Spezies über die verschmutzte Haut (siehe JENSEN (63)) oder nach dem Schlachten durch unsaubere Behandlung oder Verschmutzung in den Körper gelangte.

Ein seltener Stamm war Cl. lentoputrescens, der neben dem Kalb (einmal) auch einmal aus Schweinefleisch isoliert wurde. NARAYAN (ref. nach WILLIS (140)) isolierte ebenfalls Cl. lentoputrescens aus Schweinemuskulatur.

IV. ZUSAMMENHÄNGE ZWISCHEN DEM AUFTRETEN VON CLOSTRIDIEN UND DEM KRANKHEITSBEFUND

Durch die verletzte oder in der Permeabilität gestörte Darmschleimhaut können obligate Darmkeime (u. a. Clostridien) in den Körper gelangen. So ist ein Zusammenhang zwischen Clostridienbefund im Fleisch und Darmrupturen und -entzündungen als sicher anzunehmen.

Dies erklärt u. a. auch den hohen Anteil von Cl. perfringens und Cl. butyricum bei Kälbern. Diese Tierart ist besonders anfällig gegenüber bakteriellen Infektionen. Durch ungünstige Faktoren kommt es sehr schnell zu Dysbakterie und Enteritis. Die dadurch in den Körper gelangten Keime besiedeln neben Gelenken und Gehirn vor allem den Respirationstrakt. Die Pneumonien werden dann bei der Fleischbeschau (durch Anschnitt der Lungen) leichter festgestellt als andere Veränderungen (etwa Arthritis oder Enteritis). So werden beim Kalb Cl. perfringens und Cl. butyricum [illegible] Pneumonien als etwa mit Enteritiden in Zusammenhang gebracht. Wunden, Frakturen und Geburtsverletzungen bei Tieren werden z. B. durch Stallschmutz sehr leicht verunreinigt, was dann das Auftreten so ubiquitärer Keime wie der Clostridien erklärt.

Daß bei beiden vorliegenden Mastitiden des Rindes Cl. belfantii isoliert wurde, kann man mit den guten Wachstumsbedingungen erklären, die dieser Keim in Milch vorfindet. In Milch kommt Cl. belfantii nicht selten vor.

V. KRITISCHE GEDANKEN ZUR PRAXIS DES CLOSTRIDIENNACHWEISES BEI DER BAKTERIOLOGISCHEN FLEISCHUNTERSUCHUNG (BU)

Die Untersuchung auf Clostridien wird in der Anlage 1 zu § 20 Abs. 3a AB A des Fleischbeschaugesetzes geregelt. Es wird vorgeschrieben, mindestens eine der beiden Muskelproben in kochend heiße Leberbrühe zu versenken, mit stark erhitzter Vaseline zu überschichten und wenigstens 18 Std. bei 37°C zu bebrüten. Bei Gasbildung ist zum endgültigen Clostridiennachweis ein Ausstrichpräparat anzufertigen und nach GRAM zu färben. Bei positivem Ergebnis erfolgt nach Abs. 3b die Mitteilung an den Fleischbeschautierarzt mit der Anmerkung "Clostridien in der Muskulatur".

Kritische Anmerkungen zur Nachweismethode

1. Der Clostridiennachweis im Rahmen der BU ist aus folgenden Gründen unsicher:

   a) Der Versuch, durch kochend heiße Leberbrühe die Clostridien zu selektieren, kann zu Fehlresultaten führen (ZELLER (147)), weil nach KRAUS (82)

      - Clostridien in der Muskulatur frisch geschlachteter Tiere nicht versport sind,
      - die Versporung je nach Art verschieden langsam verläuft und
      - die Spezies verschieden stark hitzeresistent sind.

      Daraus ergibt sich die zwingende Folgerung, daß trotz Vorhandensein von Clostridien diese manchmal nicht nachgewiesen werden können, wenn diese nicht versport sind oder zu langsam versporen bzw. auskeimen und dadurch erst viel später Gasbildung zeigen oder durch die Erhitzung sogar abgetötet wurden. Es gibt z. B. hitzelabile Cl. perfringens-Stämme, die zu Lebensmittelintoxikationen führen können.

In kochender Leberbrühe können sie eventuell abgetötet und dann nicht mehr nachgewiesen werden.

b) Auch Streptokokken, Coli, Lactobazillen, bestimmte aerobe Sporenbildner usw. können Gas bilden (LEVETZOW (90)).

c) Ein Gram-gefärbtes Ausstrichpräparat kann die Diagnose allein nicht sichern, da manche Clostridien langsam versporen oder aber aerobe Sporenbildner vorliegen können.

Deshalb schlagen u. a. LEVETZOW (90) und KRAUS (82) die Verwendung selektiver Hemmstoffe vor, die z. B. bei Zusatz zu Leberbrühe nur die Clostridien wachsen ließen. So hält erster Autor das Sulfitreduzierungsvermögen, letzterer die Sorbinsäure für geeignet.

2. Das Ziel des Clostridiennachweises, Fleisch, das durch die anaeroben Sporenbildner menschenpathogen geworden sein könnte oder das durch diese Keime zur Fäulnis neigt, also vom menschlichen Genuß auszuschließen wäre, ist durch das pauschale Einbeziehen aller Clostridienspezies entschieden zu weit gespannt. Denn der größte Teil der Clostridien ruft keine Lebensmittelvergiftungen und viele auch keine Fleischveränderung hervor, da außer Cl. perfringens und Cl. sporogenes nur der sehr gefährliche Botulinus-Keim Lebensmittelintoxikationen verursachen kann. Die Mehrzahl der Clostridienspezies ist saccharolytisch aktiv, d. h. sie können Fleisch nicht zersetzen.

Es müßte demnach eine weitere Differenzierung durchgeführt werden. Dies schlagen auch HADLOK (45) und LEVETZOW (90) vor, nicht zuletzt mit dem Ziel, besonders den Anteil von Cl. botulinum in einer zentralen Erfassungsstelle zu eruieren.

3. Obendrein fehlen dem für die weitere Beurteilung und Verwendung des mit Clostridien infizierten Fleisches zuständigen Fleischbeschautierarzt spezielle Richtlinien, dadurch aber verliert der Clostridiennachweis sowohl an Wirkung als auch an Sinn.

VI. EIGENE VERBESSERUNGSVORSCHLÄGE ZUM CLOSTRIDIENNACHWEIS

1. Um andere Begleitkeime möglichst auszuschließen, sollten selektive Hemmsubstanzen wie Sorbinsäure, Sulfit oder Kristallviolett zugesetzt werden. Eine Erhitzung der Leberbrühe ist dann nicht erforderlich.

2. Bei Gasbildung ist ein Ausstrichpräparat mit Gram- oder Sporenfärbung anzufertigen.

3. Zusätzlich ist die Katalase-Probe zur endgültigen Identifizierung der katalasenegativen Clostridien erforderlich.

4. Zur Differenzierung, besonders von Cl. perfringens und Cl. botulinum z. B. durch relativ schnelle serologische Methoden, sollte eine zentrale Auswertungsstelle eingerichtet werden.

5. Als Richtlinien zur Beurteilung von mit Clostridium infiziertem Fleisch müßten gelten:

   a) untauglich für menschlichen Genuß bei Vorhandensein von Cl. botulinum, Cl. perfringens und Cl. sporogenes

   b) keine besonderen Einschränkungen bei Vorliegen anderer Clostridienarten bzw. minderwertig bei makroskopischen oder olfaktorischen Veränderungen bzw. untauglich bei fortgeschrittenen (z. B. ekelerregenden) Veränderungen.

E. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurde ein Differenzierungsschlüssel so aufgestellt, daß er die sichere Differenzierung der wichtigsten 33 Clostridienspezies erlaubt.

   Er beruht auf der mikroskopischen Beurteilung, dem Verhalten in Lackmusmilch, dem Indolbildungsvermögen, der Glucose-, Saccharose- und Lactosefermentation, der Gelatinase- und Haemolysebildung und bei Cl. perfringens-verdächtigen Stämmen auf der Beweglichkeitsprüfung. Zur Unterscheidung weiterer, kleinerer Gruppen wurden noch zusätzliche Reaktionen durchgeführt.

2. Es wurden 158 Clostridienstämme im Rahmen der BU isoliert und zwar aus Muskelproben von 67 Rindern, 46 Kälbern, 40 Schweinen, 4 Schafen und einem Pferd.

3. Durch Differenzierungsmethoden konnten unter 158 Clostridienstämmen 18 verschiedene Arten identifiziert werden, wobei Cl. butyricum (17,7%), Cl. perfringens (16,5%), Cl. sporogenes (10,8%), Cl. tertium (8,2%) und Cl. carnis (7,6%) am häufigsten vertreten waren. Die Erreger von Lebensmittelvergiftungen, Cl. perfringens und Cl. sporogenes, hatten zusammen einen Anteil von 27,3% an der Gesamtzahl der isolierten Proben. Am geringsten war der Anteil dieser Keime beim Schwein. Cl. botulinum wurde nicht gefunden. Daneben wurde 7mal der Rauschbranderreger Cl. chauvoei, 3mal der Pararauschbranderreger Cl. septicum und 4mal Cl. novyi-"oedematiens" isoliert.

4. Zum Vergleich wurden 9 Kontrollstämme (anonym) differenziert. Die Ergebnisse waren eindeutig.

5. Auffallend war der hohe Anteil von Cl. perfringens (23,9%) und Cl. butyricum (23,9%) in der Kälbermuskulatur, ebenso der nicht geringe Prozentsatz von Cl. carnis (25,0%) in Schweinefleisch.

6. Darm-Uterusrupturen, Enteritiden, Frakturen und Verletzungen zeigten eindeutig einen Zusammenhang mit dem Auftreten von Clostridien, ähnlich wie die Pleuropneumonien beim Kalb, in Verbindung

mit dem Vorkommen von Cl. perfringens und Cl. difficile.

7. Es wurden einige kritische Betrachtungen über den derzeitigen Stand des Clostridiennachweises im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU) angestellt und entsprechende Verbesserungsvorschläge gemacht.

SUMMARY

1. A differentiation-code has been set in a way that it permits exact differentiation of the most important 33 species of the genus Clostridium.

It is based on the microscopic appearance, the behavior in litmus-milk, the ability of forming indole, the fermentation of glucose, saccharose and lactose, the forming of gelatinase and haemolysis and the motility-test on cultures suspected of being Cl. perfringens.

Additional reactions were made for the definitive identification of a few smaller groups of clostridia.

2. 158 strains of clostridia were isolated in connexion with the bacteriological meat-control (BU). The isolations were made from muscular samples of 67 cattle, 46 calves, 40 pigs, 4 sheep, 1 horse.

3. By means of differentiation-methods 18 different species could be identified out of 158 strains of clostridia. Among these Cl. butyricum (17.7%), Cl. perfringens (16.5%), Cl. sporogenes (10.8%), Cl. tertium (8.2%), Cl. carnis (7.6%) appeared most frequently.

Germs of food poisoning, Cl. perfringens and Cl. sporogenes had a quote of 27.3% of the total amount of isolated strains. The smallest quote of these germs was found with the pig. Cl. botulinum could not be found.

In addition to this, germs of "black quarter" Cl. chauvoei were isolated 7 times, germs of "malignant oedema" Cl. septicum 3 times and Cl. novyi "oedematiens" 4 times.

4. By way of comparison 9 control strains (anonymous) were differentiated. The results were definite.

5. The high quote of Cl. perfringens (23.9%) and Cl. butyricum (23.9%) in the muscular system of calves was remarkable as well as the high percentage of Cl. carnis (25.0%) in pork.

6. Intestinal and uterine ruptures, enteritis, fractures and injuries showed a definite connexion with the occurrence of clostridia similar to pleuropneumonia with the calf in connexion with Cl. perfringens and Cl. difficile.

7. Some critical considerations were made in the actual level of the proof of clostridia in connexion with bacteriological meat controls (BU) and appropriate suggestions for improvement have been made.

LITERATURVERZEICHNIS

1. ACHALME, P.: Bacilles anaérobies et leur différentiation. Annls. Inst. Pasteur 16 (1902), 633 - 662.

2. ANDERSEN, A.A.: Eine Platten-Methode zur schnellen Zählung der Sporen von Clostridium botulinum. J. Bact. 62 (1951), 425.

3. ANGELOTTI, R., H.E. HALL, M.J. FOTER und K.H. LEWIS: Quantitation of Clostridium perfringens in foods. Appl. Microbiol. 10 (1962), 193 - 199.

4. ANGELOTTI, R., H.E. HALL, M.J. FOTER und K.H. LEWIS: Characteristics of Clostridium perfringens strains associated with food and food-borne disease. J. Bact. 85 (1963), 1094 - 1103.

5. BATTY, I., D. BUNTAIN und P.D. WALKER: Clostridium oedematiens: A cause of sudden death in sheep, cattle and pigs. The Vet. Rec. 76 (1964), No. 40, 1115.

6. BLADEL, B.O. und R. A. GREENBERG: Pouch method for the isolation and enumeration of Clostridia. Appl. Microbiol. 13 (1965), 281 - 285.

7. BORGSTROM, G.: Microbiological problems of frozen food products. Adv. Food Res. 6 (1955), 163 - 230.

8. BOYER, E.A.: A study of the spoilage of hams and other pork products. Am. Food J. 18 (1923), 197 - 200.

9. BOZEMANN, C.S., W.H. LINDLEY und J.W. BRANSON:
Bovine enterotoxemia.
J. Am. vet. med. Ass. 140 (1964), 937 - 938.

10. BREED, R.S., E.G.O. MURRAY und N.R. SMITH: Bergey's Manual of determinative bacteriology.
6. Aufl. (1948), The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

11. BREED, R.S., E.G.O. MURRAY und N.R. SMITH: Bergey's Manual of determinative bacteriology.
7. Aufl. (1957), The Williams and Wilkins Co., Baltimore.

12. BREKENFELD: Ergebnisse der Bakterioskopie von Fleischwaren.
Z. Unters. Lebensm. 67 (1934), 577 - 587.

13. BREWER, J.H.: A clear liquid medium for the "aerobic" cultivation of anaerobes.
J. Bact. 39 (1940), 10.

14. BROWNE, A.S., G. LYNCH, A.R. LEONARD und G. STAFFORD:
A clostridial or enterococcal food poisoning outbreak.
Publ. Hlth Rep. (Wash.) 77 (1962), 533 - 536.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 181, 474.

15. BURBIANKA, M.: Sporenbildende Anaerobier in Würsten.
Zbl. Bakt. I. Ref. 200 (1965), 389.

16. BURKE, M.V., K.H. STEINKRAUS und I.C. AYRES:
Methods for determining the incidence of putrefactive anaerobic spores in meat products.
Fd Technol. 4 (1950), 21 - 25.

17. BURRI, R.: Zur Isolierung der Anaeroben.
Zbl. Bakt. (Abt.) II, 8 (1902), 534 - 537.

18. CANADA, I.C. und D.H. STRONG: Clostridium perfringens in bovin livers.
J. Food Sci. 29/6 (1964), 862 - 864.

19. CHRISTIANSEN, L.N. und E.M. FOSTER: Wirkung der Vakuumverpackung auf das Wachstum von Clostridium botulinum und Staphylococcus aureus im Pökelfleisch.
Appl. Microbiol. 13 (1965), 1023 - 1025.

20. COCKBURN, W.C. und E. VERNON: Lebensmittelvergiftungen in England und Wales 1955.
Arch. Lebensmittelhyg. 8 (1957), 68.

21. DACK, G.M.: Current status of therapy in microbial food poisoning.
J. Am. med. Ass. 172, 9 (1960), 929 - 932.

22. DEDIC, G.A. und O.G. KOCH: Aerobic cultivation of Cl. tetani in the presence of cobalt.
J. Bact. 71 (1956), 126.

23. DE RIU, G.C.: Über das Vorkommen von Clostridien-Keimträgern in geschlossenen und halbgeschlossenen Gemeinschaften der Stadt Sassari.
Igiene mod. 58, 5/6 (1965), 284.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 206, 129.

24. DISCHE, F.E. und S.D. ELEK: Experimental food-poisoning by Clostridium welchii.
Lancet, 2 (1957), 71 - 74.

25. DOLMAN, C.E.: Clostridium botulinum, Typ E.
Ztschr. Lebensmittelhyg. 99 (1953), 136.
VI. Intern. Mikrobiol. Kongr. i. Rom 1953.

26. DUNCAN, C.L. und D.H. STRONG: Improved medium for sporulation of Clostridium perfringens.
Appl. Microbiol. Vol. 16, 1 (1968), 82 - 89.

27. DUNCAN, I.T.: Two outbreaks of food poisoning. Monthly Bull. Ministry Health and Publ. Health Lab. Serv. 3 (1944), 61.

28. EHRISMANN, O.: Ascorbinsäurehaltige Nährmedien für anaerobe Bacillen. Ztschr. f. Hyg. u. Infekt. Krankh. 118 (1936), 544 - 554.

29. ELLIOTT, R.P. und H.D. MICHENER: Microbiological process report. Microbiological standards and handling codes for chilled and frozen foods. A review. Appl. Microbiol. 9 (1961), 452.

30. ELLNER, P.D.: A medium promoting rapid quantitative sporulation in Clostridium perfringens. J. Bact. 71 (1956), 495 - 496.

31. ELTER, B. und E. SCHARNER: Vorkommen und Bedeutung von Clostridium perfringens in Fleisch und Fleischprodukten. Fleisch-Gewinnung-Fl. Verarbeit. 22 Jhrg. 1 (1968), 6 - 10.

32. ESTOLA, T. und H. STENBERG: Über das Vorkommen von Clostridien bei Haustieren und Produkten tierischer Herkunft. Nord. Vet. Med. 15 (1963), 35.

33. ESTY, I.R. und K.F. MEYER: The heat resistence of the spores of B. botulinus and allied anaerobes. J. infect. Dis. 31 (1922), 650 - 663.

34. FABIAN, F.W.: Food preservation by the use of microorganisms. The chemistry and technology of food and food products, Vol. II, Interscience, New York (1944), 371.

35. FILDES, P.: Anaerobic cultivation. Chapter VI in System of Bacteriology, Vol. 9 (1931), Medical Research Council (Gr. Britain).

36. FINDLAY, C.R. und D. BUNTAIN: Enterotoxaemia due to Clostridium welchii type C in young lambs. Vet. Rec. Vol. 82/8 (1968), 224 - 225.

37. FORGET, A. und V. FREDETTE: Sodium azide selective medium for the primary isolation of anaerobic bacteria. J. Bact. 83 (1962), 1217 - 1223.

38. FORTNER, J.: Zur Technik der anaeroben Züchtung. II. Zur Differenzierung der Anaerobier. Zbl. Bakt. I. Orig. 110 (1929), 233.

39. FRANK, H.A. und L.L. CAMPBELL: The influence of recovery media on thermal resistence values of spores of a putrefactive anaerobic bacterium. Appl. Microbiol. 3 (1955), 300 - 302.

40. FRAZIER, W.C.: Food microbiology. McGraw-Hill Book Co., Inc., New York (1958), 472.

41. GECK, P. und R. SZÁNTÒ: Examination of Clostridium perfringens with the fluorescent tracer technique. Acta microbiol. acad. sci. hung. 8 (1961), 423 - 425. Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 187, 4.

42. GECK, P. und R. SZÁNTÒ: Über die Untersuchung von Clostridium perfringens mit der Immunfluoreszenz-Methode. Kisérletes Orvostudomány 14/3 (1962), 242. Zbl. Bakt. I. Ref. 189, 2 - 3.

43. GREENBERG, R.A., B.O. BLADEL und W.J. ZINGELMANN: Use of the anaerobic pouch in isolating Clostridium botulinum spores from fresh meats. Appl. Microbiol. 14/2 (1966), 223 - 228.

44. GUTHOF, O.: Anaerobier-Züchtung im Vakuumplattenverfahren. Zbl. Bakt. I. Orig. 161 (1954), 298.

45. HADLOK, R., E. GRUNWALD und H. BARTELS: Untersuchung zur Abtrennung von Clostridium botulinum von anderen Clostridienarten im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung. Fleischwirtschaft 1968, No 1, 39 - 44.

46. HALL, H.E. und R. ANGELOTTI: Clostridium perfringens in meat and meat products. Appl. Microbiol. 13 (1965), 352.

47. HALLMANN, L.: Bakteriologie und Serologie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart. 3. Aufl. (1955).

48. HALLMANN, L.: Bakteriologische Nährböden. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1955).

49. HALVORSON, H.O.: Food spoilage and food poisoning. The chemistry and technology of food and food products. Vol. I. Interscience, New York, (1944), 368.

50. HANSEN, N.H. und H. RIEMANN: Mikrobiologische Beschaffenheit von vorverpacktem Fleisch und vorverpackten Fleischwaren. Fleischwirtschaft 14 (1962), 861-862, 865-868.

51. HARRIMAN, L.A., V. J. DEL GIUDICE, B.M. SHINN und R. HANSEN: The incidence of putrefactive anaerobes in pork. Peoria, Ill. Oct. 15 (1948). Ref. aus Fd Technol. 6 (1952), 259.

52. HART, C.I., W.W. SHERWOOD und E. WILSON: A food poisoning outbreak a common carrier.
Publ. Hlth Rep., Wash., 75 (1960), 527-531.

53. HAUPT, H.: Medizinische Bakteriologische Diagnostik.
Ferd. Enke Verl., Stuttgart, (1963), 263-286.

54. HAUSCHILD, A.H.W. und F.S. THATCHER: Experimental food poisoning with heat-susceptible Clostridium perfringens Typ A.
J. Fd Sci. Vol. 32/4 (1967), 467.

55. HEIDRICH, H.J. und D. GROSSKLAUS: Zwei Fälle einer durch Clostridium perfringens verursachten akuten Mastitis beim Rind.
Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 72 (1959), 1.

56. HEPP, L.: Zur Frage des Anaerobennachweises bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Zbl. Vet.Med. 3 (1956), 88-109.

57. HOBBS, B.C.: The intensity of bacterial contamination in relation to food poisoning with special reference to Clostridium welchii.
Intern. Congr. Microbiol., 6th Congr. (Rome) 3 (1953), 288-289.

58. HOBBS, B.C., M.E. SMITH, C.L. OAKLEY, G.H. WARRACK und I.C. CRUICKSHANK: Clostridium welchii food poisoning.
J. Hyg. 51 (1953), 75-101.

59. HOBBS, B.C. und J.G. WILSON: Contamination of wholesale meat supplies with Salmonellae and heat resistant Clostridium welchii.
Monthl. Bull. Min. Health Publ. Health Lab. Serv. 18 (1959), 198-206.

60. HØGH, P.: Durch Clostridium perfringens Typ C verursachte Enterotoxämie bei Ferkeln.
Nord. Vet.Med. 17 (1965), 1 - 8.
Ref.: Berl. Münch. tierärztl. Wschr. 1967, 4, 78.

61. HOWES, E.L., I. MANDL und S. ZAFFUTO: Toxicity of enzymes from Clostridium histolyticum.
J. Bact. 79 (1960), 191.

62. HUET, M.: Clostridium sordellii non pathogèn, variété bien défini et fréquement rencontré.
Archs. Inst. Pasteur Tunis 38/2 (1961), 129.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 184, 543.

63. JENSEN, L.B.: Microbiology of meats.
2nd ed., (1945), Garrard Press, Champaign, Ill.

64. JENSEN, L.B. und W.R. HESS: Fermentation in meat products by the genus Bacillus.
Food Res. 6 (1941), 75 - 83.

65. JUSATZ, H.J.: Zur Technik des Fortnerschen Anaerobierzüchtungsverfahrens.
Zbl. Bakt. I. Orig. 127 (1933), 212.

66. KATITCH, R.V.: Diagnostic différentiel du Clostridium septicum et du Clostridium chauvoei.
Rev. Immunol. (Paris) 27, 1/2 (1963), 21.

67. KAUFMAN, L. und R.H. WEAVER: Use of neutral red fluorescence for the identification of colonies of clostridia.
J. Bact. 79 (1960), 292 - 294.

68. KAUFMAN, L. und R.H. WEAVER: Rapid methods for the identification of clostridia.
J. Bact. 79 (1960), 119.

69. KELCH, F.: Zum Nachweis anaerober Bazillen in einem flüssigen Nährsubstrat.
Arch. Lebensmittelhyg. 6 (1955), 263.

70. KELCH, F.: Über den Nachweis von Anaerobiern bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Arch. Lebensmittelhyg. 7 (1956), 25 - 27.

71. KELCH, F.: Ein neuer Nährboden für die Züchtung obligat anaerober Bazillen.
Arch. Lebensmittelhyg. 7 (1956), 127 - 129.

72. KELCH, F.: Differenzierung von Clostridien aus Fleischkonserven.
Zbl. Vet.Med. 4 (1957), 721 - 746.

73. KEMPE, L.L. und J.T. GRAIKOSKI: Gamma-ray sterilization and residual toxicity studies of ground beef inoculated with spores of Clostridium botulinum.
Appl. Microbiol. 10 (1962), 31 - 36.

74. KERRY, J.B.: A note on the occurence of Clostridium chauvoei in the spleens and livers of normal cattle.
Vet. Rec. Vol. 76, No. 14 (1964), 396.

75. KLATT, C.H.: Über einige, durch Cl. perfringens verursachte Lebensmittelvergiftungen.
Finsk Vet Tidskr. Jhrg. 67 (1961), 562.

76. KLEINSORGEN, W. und H.J. JUSATZ: Die Vervollkommnung der Fortnerschen Anaerobenzüchtung durch Anwendung eines kombinierten Gummi-Cellulose-Ringes mit Druckklammerverschluß.
Zbl. Bakt. I. Orig. 126 (1932), 157.

77. KNETEMAN, A.: A method for the cultivation of anaerobic spore forming bacteria.
J. appl. Bact. 20 (1957), 101 - 107.

78. KNÖSEL, H.: Auswertung der Kälbersektionen der Jahre 1961 bis 1965.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 74. Jhrg. 20 (1967), 511 - 513.

79. KNOX, R. und E.K. MacDONALD: Outbreaks of food poisoning in certain Leicester institutions.
Med. Officer 69 (1943), 21 - 22.

80. KOCH, F.E.: Einfache Anaerobenzüchtung in Petrischalen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 132 (1934), 358 - 365.

81. KOCH, R.B. und A. ANELLIS: Comperative resistance of strains of Clostridium botulinum to gamma rays.
Appl. Microbiol. 10 (1962), 326 - 330.

82. KRAUS, H.: Neuzeitliche diagnostische Laboratoriumsverfahren unter besonderer Berücksichtigung des Clostridiennachweises im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Fleischwirtschaft 10 (1962), 980.
Schlacht- u. Viehhof-Ztg. 10, 357.

83. KUTZNER, H.J.: Untersuchungen an Clostridien mit besonderer Berücksichtigung der für die Milchwirtschaft wichtigen Arten.
Zbl. Bakt. Abt. I. Orig. 191 (1963), 441 - 450.

84. KUTZNER, H.J.: Prinzipien der Anreicherung und Isolierung von Clostridien.
Zbl. Bakt. I. Abt. Supplementhft. 1 (1964), 363-393.

85. LEISTNER, L.: Ein einfaches Verfahren zur Zählung und Züchtung von Anaeroben.
Fleischwirtschaft 7 (1955), 109.

86. LEISTNER, L.: Die Anaeroben im Fleisch verarbeitenden Betrieb.
Fleischwirtschaft 8 (1956), 255.

87. LEISTNER, L.: Aufgabe für die Lebensmittel-Mikrobiologie. Fleischwirtschaft 47 (1967), 25 - 28.

88. LERCHE, M., H. RIEVEL und V. GOERTTLER: Lehrbuch der Tierärztlichen Lebensmittelüberwachung. Verl. M. & H. Schaper, Hannover (1957).

89. LEVETZOW, R.: Ein Beitrag zum Clostridiennachweis bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU). Arch. Lebensmittelhyg. 18. Jhrg., 10 (1967), 217.

90. LEVETZOW, R.: Über die Notwendigkeit, den Nachweis von Clostridium im Rahmen der BU neu zu regeln. Fleischwirtschaft 12 (1968), 1676.

91. LEWIS, K.H. und K.J. CASSEL: Botulism. Publ. Health Service Publication No. 999, 1 (1964).

92. LINZENMEIER, G.: Lebensmittelvergiftung durch Gasbranderreger. Öffentl. Gesundheitsdienst 17 (1956), 708-712.

93. LUND, A.J.: Investigation of factors influencing food sterilization and preservation: sporulation in the genus Clostridium. Annual Report of the Hormel Institute, University of Minnesota, (1956), 88 - 97.

94. MANSSON, I. und B. OLSSON: The presence of anaerobic bacteria of Clostridium type in intestinal content and certain skin changes in pigs. Acta path. microbiol. scand. 51, Suppl. 144 (1961), 257.

95. McCLUNG, L.S.: On the enrichment and purification of chromogenic sporeforming anaerobic bacteria. J. Bact. 46 (1943), 507 - 512.

96. McKILLOP, E.J.: Bacterial contamination of hospital food, with special reference to Cl. welchii food poisoning.
J. Hyg. 57 (1959), 31 - 46.

97. McLENNAN, J.D.: The histotoxic clostridial infections of man.
Bact. Rev. 26 (1962), 177 - 274.

98. MEYN, A.: Über das Vorkommen und den Nachweis anaerober Bazillen in der Milch.
Milchwirtschaftl. Forsch. 15 (1933), 426.

99. MOCHMANN, H. und K. ZIEGLER: Botulismus.
Landarzt 36 (1961), 1433.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 187, 2.

100. MOSCHELL, I.: Ein Beitrag zur Bestimmung obligater Anaerobier in Fleisch und Fleischwaren.
Berl. u. Münch. tierärztl. Wschr. 71 (1958), 29 - 31.

101. MOSSEL, D.A.A.: Aufgaben und Durchführung der modernen hygienischen bakteriologischen Lebensmittelüberwachung.
Wien. tierärztl. Mschr. 43 (1956), 321 - 340, 596 - 610.

102. MOSSEL, D.A.A.: Enumerating of sulfite-reducing clostridia occuring in foods.
J. Sci. Fd Agr. 10 (1959), 662 - 669.

103. MOSSEL, D.A.A., J. BECHET und R. LAMBION:
La prévention des infections et des toxi-infections alimentaires.
Bruxelles, Coop. Ed. Ind. Aliment. (1962), 289.

104. MOSSEL, D.A.A. und B. KROL: Die selektive Zählung von proteolytischen Clostridien in Lebensmitteln mit Hilfe der Drei-Schicht-Platte (Überschichtungsplatte) nach Leistner.
Arch. Lebensmittelhyg. 7 (1956), 193.

105. MÜLLER, J.: Botulismus beim Rind und Pferd.
Medlemsbl. danske Dyrlaegeforening 43 (1960), 791 - 796.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 183, 206.

106. MÜLLER, J.: C-Botulismus bei Menschen und Tieren (mit besonderer Berücksichtigung dieser Krankheit beim Rind und Pferd).
Medlemsbl. danske Dyrlaegeforening 44 (1961), 547 - 557.
Ref.: Zbl. Bakt. Ref. I. 183, 206.

107. MÜLLER, R.: Medizinische Mikrobiologie.
Urban & Schwarzenberg Verl., München - Berlin (1950).

108. MURELL, T.G.C., J.R. EGERTON, A. RAMPLING, J. SAMELS und P.D. WALKER: The ecology and epidemiology of the pig-bel syndrom in man in New Guinea.
J. Hyg. (London) 64 (1966), 375 - 396.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 210, 384.

109. NIKODÉMUSZ, I.F.: Über das Vorkommen von Clostridien in Lebensmittelprodukten und ihre Rolle bei Lebensmittelschädigungen.
Zbl. Bakt. I. Orig. 177 (1960), 403.

110. NIKODÉMUSZ, I., D. BOUQUET und T. NOVOTNY: Die Ätiologie der Lebensmittelvergiftungen in verschiedenen Ländern, unter besonderer Berücksichtigung der ungarischen Verhältnisse.
Népegészségügy 44 (1964), 337.

111. NIKODÉMUSZ, I., K. CSABA und L. ORMAY: Über einen mit Laboratoriumsmethoden verifizierten Botulismus-Fall.
Ov. Hetil. 101 (1960), 1856.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 183, 205.

112. NYGREN, B.: Lecithinase-producing bacteria and food poisoning.
Acta pathol. microbiol. scand. 1961, Suppl. No. 144.

113. NYGREN, B.: Continued studies on Cl. perfringens and B. cereus as causes of food poisoning.
Acta pathol. microbiol. scand. 56 (1962), 108.

114. PRÉVOT, A.R.: Researches sur la reduction des sulfates et des sulfites mineraux par les bacteries anaerobies.
Annls. Inst. Pasteur 75 (1948), 571.

115. PUT, H.: Sulfitoréduction et sulfito-sensibilité de Clostridia. Considération taxonomique et pratiques.
Annls. Inst. Pasteur (Lille) 12 (1961), 175 - 181.

116. RALOVICH, B. und K. BARNA: Durch toxikologische und bakteriologische Untersuchungen erwiesener Typ-B-Botulismus.
Zbl. Bakt. I. Orig. 200 (1966), 509.

117. RRED, G.B. und J.H. ORR: Rapid identification of gas gangrene anaerobes.
War. Med. 1 (1941), 493 - 510.

118. ROOTS, E.: Die Begünstigung des Anaerobenwachstums durch Hinzufügen von Leberbestandteilen zum Zeisslerschen Blutagarnährboden.
Zbl. Bakt. I. Orig. 149 (1942), 251.

119. SCHMIDT, E.: Beitrag zur Anaerobenzüchtung.
Zbl. Bakt. I. Orig. 127 (1933), 378.

120. SCHOOP, G.: Trennung von Anaerobiern und Sauerstoffzehrern im FORTNER-Verfahren durch Glasplatte.
Zbl. Bakt. I. Orig. 136 (1936), 509.

121. SCHOOP, G.: Nachweis von Clostridium botulinum Typ C bei Rindern.
Dtsch. tierärztl. Wschr. 68 (1961), 71 - 72.

122. SEBALD, M. und A.R. PRÉVOT: Étude qualitative et quantitative du pouvoir lipolytique de 86 souches de Clostridium anaérobies.
Annls. Inst. Pasteur (Paris) 99 (1960), 386 - 400.

123. SERGEVA, T.: Nachweis von Botulinus-Toxin und des Typ-A-Keimes in den Organen von Kranken und Tierkadavern.
Zh. Microbiol. (Mosk.) 5 (1926), 96.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 193, 329.

124. SHANK, J.L.: Application of the plastic film technique in the isolation and study of anaerobic bacteria.
J. Bact. 86 (1963), 95 - 100.

125. SINELL, H.-J. und R. LEVETZOW: Sulfitreduzierende Clostridien in vorverpackten Fleischwaren.
Fleischwirtschaft, 47. Jhrg., 4 (1967), 392 - 396.

126. SINELL, H.-J. und R. LEVETZOW: Beitrag zur quantitativen Bestimmung von Clostridien in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 18 (1967), 73.

127. SKERMAN, V.B.D.: Genera of Bacteria.
A guide to the identification of the genera of bacteria.
The Williams & Wilkins Company, Baltimore 2, Maryland (1959).

128. SKULBERG, A.: Human botulism in Norway.
Nordisk. Vet. Med. 13 (1961), 84-86.
Ref.: Zbl. Bakt. I. Ref. 183, 206

129. SPRAY, R.S.: Semisolid media for cultivation and identification of the sporulating anaerobes.
J. Bact. 32 (1936), 135-155.

130. STEINKRAUS, K.H. und J.C. AYRES: Incidence of putrefactive anaerobic spores in meat.
J. Fd Sci. 29 (1964), 87-93.

131. STRONG, D.H., I.C. CANADA und B.B. GRIFFITHS: Incidence of Clostridium perfringens in American food.
Appl. Microbiol. 11 (1963), 42-44.

132. STUMBO, C.B., J.R. MURPHY und J. COCHRAN: Nature of the thermal death time curves for P.A. 3679 and Clostridium botulinum.
Fd Technol. 4 (1950), 321-326.

133. SUTTON, R.G.A.: Enumeration of Clostridium welchii in the faeces of varying sections of the human population.
J. Hyg. (Lond.) 64 (1966), 367-373.

134. TAKÁCS, I. und K.G. NARAYAN: Über das Silfit-Reduzierungsvermögen von Clostridien in einem modifizierten Nährmedium.
Magyar Allatorvosok Lapja 20 (1965), 211-214.
Ref.: Arch. Lebensmittelhyg. 16 (12), 282.

135. TAROZZI, G.: Über ein leicht in aerober Weise ausführbares Kulturmittel von einigen bis jetzt für strenge Anaeroben gehaltenen Keimen. Zbl. Bakt. I. Orig. 36 (1905), 619 - 624.

136. TSUJI, K. und W.E. PERKINS: Sporulation of Clostridium botulinum. II. Effect of arginine and its degradation products on sporulation in a synthetic medium. J. Bact. 84 (1962), 86 - 94.

137. ULRICH, J.A. und H.O. HALVORSON: Chemical and microbial studies on sliced canned bacon. Adv. Food Res. 3 (1951), 291.

138. VIERLING, R.: Einfluß verschiedener Antibiotica auf die Morphologie und die Toxinbildung von Clostridium botulinum Typ A. Zbl. Bakt. I. Orig. 185 (1962), 195.

139. WILLIAMS, B.M.: Clostridium oedematiens infections (Black diseases and Bacillary haemoglobinuria) of cattle in Mid Wales. Vet. Rec. 76 (1964), No. 22, 591.

140. WILLIS, A.T.: Clostridia of wound infection. Butterworths London (1969).

141. WILLIS, A.T. und G. HOBBS: Some new media for the isolation and identification of Clostridia. J. Path. Bact. 77 (1959), 511 - 521.

142. WILSON, W.J. und E.M.M. BLAIR: The application of a sulphite-glucose-iron agar medium to the quantitative estimation of B. welchii and other reducing bacteria in water supplies. J. Path. Bact. 27 (1924), 119 - 121.

143. WOHLFAHRT, G.: Vergleiche zwischen Traubenzuckeragar und der Leber-Leberbouillon nach TAROZZI in ihrer Eignung für die Amaerobenfeststellung bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung unter gleichzeitiger Differenzierung der ermittelten Keime.
Vet.med. Diss. München (1952).

144. WYNNE, E.S., W.R. SCHMIEDING und G.T. DAYE: A simplified medium for counting Clostridium spores.
Food Res. 20 (1955), 9 - 12.

145. YORK, G.K. und R.H. VAUGHN: Use of sorbic acid enrichment media for species of Clostridium.
J. Bact. 68 (1954), 739 - 744.

146. ZEISSLER, J.: Anaerobenzüchtung - Handbuch der pathogenen Mikroorganismen.
3. Aufl. Jena, Band 10 (1930), 35 - 144.

147. ZELLER, M.: Zur Frage des Anaerobiernachweises bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung.
Arch. Lebensmittelhyg. 6 (1955), 146 - 148.

148. ZELLER, M.: Eine einfache Methode zum Nachweis von Botulinustoxinen und -bazillen.
Arch. Lebensmittelhyg. 15/4 (1964), 84 - 87.

149. ZELLER, M. und H. RENZ: Clostridium perfringens als Ursache einer Gärung bei Leberwurstbrät.
Arch. Lebensmittelhyg. 12 (1961), 233.

Herrn Prof. Dr. L. KOTTER danke ich für die freundliche Überlassung des Themas herzlich.

Herrn Dr. W. KUNDRAT bin ich für seine wertvollen Anregungen, seine stets gewährte Unterstützung und seine ehrliche Anteilnahme am Gelingen der Arbeit zu aufrichtigem Dank verpflichtet.

Herrn Dr. J. PÜSCHNER bin ich für die Bereitstellung des Untersuchungsmaterials und sein Interesse an der Arbeit Dank schuldig.

LEBENSLAUF

Am 22. 9. 1943 wurde ich als Sohn des Tierarztes Dr. Nikolaus Stöhr und seiner Frau Ingeborg geb. Olbertz in Indjija (Jugoslawien) geboren.

Von 1949 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Wollomoos (Kreis Aichach) und nach bestandener Aufnahmeprüfung das Humanistische Gymnasium Scheyern, wo ich 1964 die Reifeprüfung mit Erfolg ablegte.

Von 1964 bis 1969 studierte ich an der Universität München Tiermedizin.

Am 8. 8. 1969 erhielt ich die Bestallung als Tierarzt.